

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

en association avec

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE BIOTECHNOLOGIES ENZYMATIQUES POUR LA  
DÉCOLORATION D'ENCRES ET LE CONTRÔLE DE LA POIX DU BOIS

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
ETIENNE DUBÉ

AOÛT 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais, tout d'abord, remercier mon directeur de thèse Monsieur Claude Daneault, mon codirecteur Monsieur Marc Beauregard, Monsieur François Shareck, professeur à l'Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier et Monsieur Yves Hurtubise, directeur de recherche chez AgroTerra Biotech, pour m'avoir accepté dans leur équipe de recherche durant mes études. De plus, je veux les remercier pour leur soutien et leurs bons conseils qui m'ont permis de me rendre jusqu'au bout de mon doctorat et de passer à travers des moments parfois plus difficiles. Je désire aussi remercier mes coéquipiers de travail : Vicky Houle, Fatma Meddeb, Mylène Gagnon ainsi que Michel Paquin du CIPP qui m'ont aidé de plusieurs façons au cours de mon doctorat que ce soit au niveau professionnel ou au niveau personnel. Je leur suis reconnaissant de m'avoir donné de leur temps et de leur support moral lorsque le découragement se présentait dans mes pensées. J'ai eu bien du plaisir avec eux que ce soit sur ou en dehors des heures de travail lors de souper ou activités diverses. Finalement, je remercie tous mes amis(es) et ma famille qui m'ont encouragé durant mes longues études.

## AVANT-PROPOS

Les réactions d'oxydations sont essentielles dans plusieurs types d'industries mais la plupart des technologies conventionnelles ont des inconvénients majeurs : la plupart des réactions sont non-spécifiques et ils utilisent des produits chimiques dommageables pour l'environnement. Ces inconvénients ont incité la recherche de nouvelles technologies d'oxydation basées sur des systèmes biologiques tels que des réactions enzymatiques. Ces biotechnologies ont l'avantage de ne pas avoir les inconvénients des technologies d'oxydation chimiques : les enzymes sont spécifiques et biodégradable.

La laccase (benzenediol : oxydoréductase; EC 1.10.3.2) est une enzyme particulièrement intéressante et prometteuse pour l'avenir des biotechnologies. Ce groupe particulier d'enzymes a reçu beaucoup d'attentions de la part des chercheurs à cause de leur facilité à oxyder les composés phénoliques et non-phénoliques de la lignine, avec l'aide de médiateurs, ainsi que certains polluants persistants dans l'environnement (Jolival et al., 1999; Xu, 1996; Thurston, 1994; Rodriguez Couto et al., 2006). L'importance biotechnologique de ces enzymes peut être également attribuée à leur capacité à maintenir une activité substantielle dans des solvants organiques, ouvrant ainsi la porte à des applications en synthèse organique (Burton, 2003). Les biotechnologies enzymatiques avec la laccase ont des potentiels d'applications dans plusieurs types d'industries tels que les pâtes et papiers, le textile, l'hygiène et l'alimentation. Elles ont des utilisations très variées telles que la décoloration et la détoxification des effluents, le blanchiment de la pâte à papier, la réduction des composés phénoliques dans le vin et la décoloration du denim dans l'industrie du textile, certaines de ces applications ayant déjà été brevetées (Yaver et al., 2001; Mayer et Staples, 2002; Rodriguez Couto et al., 2006).

Cette thèse de doctorat porte sur le développement de biotechnologies enzymatiques, utilisant la laccase, applicables dans le secteur de l'industrie du textile et de l'industrie papetière. Les travaux ont porté sur les applications suivantes :

- La décoloration de différentes encres d'intérêts dans l'industrie du textile pour le blanchiment du denim et la décoloration d'effluents industriels;
- Le contrôle de la poix dans l'industrie papetière.

Cette thèse est divisée en 5 parties :

1. Chapitre I : Introduction à la laccase. Ce chapitre traite de l'origine, de la distribution des laccases, de sa classification et des réactions enzymatiques. Il y aura également une discussion sur sa caractérisation, le concept laccase-médiateur et les applications biotechnologiques basées sur cette enzyme.
2. Chapitre II : Article scientifique 1. Ce chapitre traite du clonage, de la production et de la caractérisation d'une laccase bactérienne en vue de son utilisation dans l'industrie du textile.
3. Chapitre III : Article scientifique 2. Ce chapitre traite de l'application de la laccase bactérienne pour la décoloration de diverses encres en vue de son application pour le blanchiment du denim et le traitement d'effluents industriels.
4. Chapitre IV : Article scientifique 3. Ce chapitre traite du contrôle de la poix dans l'industrie papetière. Une combinaison de différentes technologies enzymatiques sera présentée en vue d'une application sur de la pâte à papier et pour le traitement des eaux usées de procédé.
5. Chapitre V : Synthèse et conclusion. Ce chapitre fait une rétrospective des différentes recherches effectuées ainsi que des résultats obtenus au cours de ce doctorat. Les travaux futurs sont également abordés.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
------------------------	----

LISTE DES TABLEAUX.....	xii
-------------------------	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
-----------------------------	------

RÉSUMÉ .....	xv
--------------	----

### CHAPITRE I

#### INTRODUCTION À LA LACCASE

1.1	Origine et distribution des laccases.....	1
1.2	Classification et réactions enzymatiques des laccases.....	3
1.3	Caractérisation des laccases .....	5
1.4	Le système laccase-médiateur.....	9
1.5	Applications biotechnologiques des laccases .....	11
1.5.1	Applications dans l'industrie du textile.....	11
1.5.2	Applications dans l'industrie de l'alimentation .....	13
1.5.3	Applications dans l'industrie papetière .....	14
1.5.4	Décontamination des sols.....	15
1.5.5	Applications dans l'industrie des cosmétiques .....	15
1.5.6	Biosenseurs .....	16
1.5.7	Synthèse organique .....	16

### CHAPITRE II

#### ARTICLE SCIENTIFIQUE 1

2.1	Résumé.....	17
-----	-------------	----

2.2	Présentation de l'article et contribution des auteurs .....	18
2.3	Abstract .....	19
2.4	Introduction .....	19
2.5	Materials and methods .....	20
2.5.1	Substrates and chemicals.....	20
2.5.2	Organisms and vectors .....	20
2.5.3	Cloning of the laccase gene.....	20
2.5.4	Culture conditions .....	20
2.5.5	Protein purification.....	21
2.5.6	Enzymatic activity and protein determination .....	21
2.5.7	Gel electrophoresis.....	21
2.5.8	Effect of pH on laccase activity and stability.....	21
2.5.9	Effect of temperature on laccase activity and stability .....	21
2.5.10	Inhibitors effect on laccase activity.....	21
2.5.11	Dye decolourization by laccase.....	21
2.6	Results.....	21
2.6.1	Cloning of the laccase gene from <i>S. coelicolor</i> in <i>S. lividans</i> .....	21
2.6.2	Expression of the laccase gene in <i>S. lividans</i> .....	22
2.6.3	Effect of pH on laccase activity and stability.....	22
2.6.4	Effect of temperature on laccase activity and stability .....	22
2.6.5	Inhibitors effect on laccase activity.....	23
2.6.6	Dye decolourization by laccase.....	23
2.7	Discussion .....	23
2.8	Acknowledgements .....	24
2.9	References .....	24
CHAPITRE III		
ARTICLE SCIENTIFIQUE 2		
3.1	Résumé.....	26

3.2	Présentation de l'article et contribution des auteurs .....	27
3.3	Abstract .....	28
3.4	Introduction.....	28
3.5	Materials and methods .....	29
	3.5.1 Substrates and chemicals.....	29
	3.5.2 Protein purification.....	29
	3.5.3 Enzymatic activity and protein determination .....	29
	3.5.4 Screening of mediators.....	30
	3.5.5 Effect of pH on decolourization.....	30
	3.5.6 Dyes decolourization by laccase .....	30
	3.5.7 Data analysis.....	30
3.6	Results.....	30
	3.6.1 Mediator screening and dye decolourization conditions.....	30
	3.6.2 Decolourization of different types of dyes.....	31
3.7	Discussion .....	32
3.8	Conclusion.....	33
3.9	Acknowledgements.....	33
3.10	References .....	33

## CHAPITRE IV

### ARTICLE SCIENTIFIQUE 3

4.1	Résumé.....	35
4.2	Présentation de l'article et contribution des auteurs .....	36
4.3	Abstract .....	37
4.4	Introduction.....	37
4.5	Materials and methods .....	38
	4.5.1 Substrates and chemicals.....	38
	4.5.2 Protein purification.....	38
	4.5.3 Enzymatic activity determination .....	38



4.5.4	Pulp sample .....	38
4.5.5	Biochemical treatments of the pulp samples.....	38
4.5.6	Laccase treatment of the process water samples.....	39
4.5.7	Pulp and process water extractives recovery .....	39
4.5.8	Gas chromatography .....	39
4.6	Results and discussion .....	39
4.6.1	Biochemical treatments of the softwood TM.....	39
4.6.2	Enzymatic treatment of the TMP process water .....	40
4.7	Conclusion .....	41
4.8	Acknowledgements.....	41
4.9	References.....	41

## CHAPITRE V

### SYNTHÈSE ET CONCLUSION

5.1	Synthèse des développements biotechnologiques pour l'industrie du textile.....	43
5.2	Synthèse des développements biotechnologiques pour l'industrie papetière .....	57
5.3	Conclusion et travaux futurs .....	64

BIBLIOGRAPHIE .....	67
---------------------	----

## LISTE DES FIGURES

Figure .....	Page
1.1 Photo de <i>Trametes versicolor</i> .....	2
1.2 Oxydation de groupes phénoliques de la lignine par la laccase (tiré de Archibald et al., 1997) .....	4
1.3 Vue de la structure tridimensionnelle de la laccase II de <i>Trametes versicolor</i> .....	6
1.4 Vue rapprochée du site du cuivre de type T1 de <i>Trametes versicolor</i> .....	7
1.5 Vue rapprochée du site des cuivres de type T2/T3 de <i>Trametes versicolor</i> .....	8
1.6 Oxydation de groupes non-phénoliques de la lignine par le biais du système laccase-ABTS (tiré de Archibald et al., 1997) .....	10
1.7 Structure chimique de 10 différents médiateurs naturels (a à j) et 7 différents médiateurs synthétiques (k à r) pour la laccase .....	12
2.1 SDS-PAGE (A) and native PAGE (B) analysis of laccase from <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	21
2.2 Effect of pH on the activity of SLAC .....	21
2.3 Effect of thermal denaturation of TvLac and SLAC .....	21
2.4 Effect of temperature on stability at 70°C for TvLac and SLAC .....	22

2.5	Decolourization of Indigo carmine by SLAC .....	22
3.1	Mediators used in this study .....	30
3.2	Dyes used in this study .....	31
3.3	Mediators screening via the decolourization of AB74 with SLAC .....	31
3.4	Effect of pH on the activity of SLAC.....	31
3.5	Effect of pH on mediator oxidation of AB74 .....	32
3.6	Effect of mediator concentration on the oxidation of AB74.....	32
4.1	Proposed mechanism for the laccase-catalysed modification of linoleic acid and its esters .....	41
5.1	Photo de <i>Rhus vernicifera</i> .....	43
5.2	Structure chimique de la benzidine .....	50
5.3	Alignement global des acides aminés de la séquence de SLAC vs STSL selon la méthode Blosum 62.....	53
5.4	Alignement global des acides aminés de la séquence de SLAC vs EpoA selon la méthode Blosum 62.....	54
5.5	Décoloration du denim par le biais d'un système laccase-médiateur .....	56

5.6	Exemples de matières extractibles évaluées dans cette étude.....	58
5.7	Impact de la poix sur la qualité de fabrication de papiers recyclés.....	59
5.8	Structure protéique 3D de la lipase de <i>Streptomyces exfoliatus</i> .....	61

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Inhibitors effect on laccase activity .....	22
3.1	Decolourization of five dyes by SLAC with or without mediators, for different time treatment, at pH 9.0, 45°C .....	32
4.1	Pulp extractives removal by different biochemical methods after a 2 hours treatment at 60°C.....	40
4.2	Process water extractives removal by laccase enzymes after a 2 hours treatment at 60°C.....	40
5.1	Synthèses des différentes applications de la laccase.....	45

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AB74	Bleu acide 74, Indigo carmine
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
Ace	Acétosyringone
BFTSA	N,o-Bis (Triméthylsilyl) trifluoroacétamide
bp	Paire de base
CR	Rouge de Congo
CotA	Laccase de <i>Bacillus subtilis</i>
Ctl	Échantillon de contrôle
DNA	Acide déoxyribonucléique
DMP	2,6-diméthoxyphénol
DSB6b	Bleu de Chicago 6b
$\epsilon$	Coefficient d'extinction molaire
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPA-USA	Agence de protection de l'environnement des États-Unis
EPR	Résonance électroparamagnétique
GC-FID	Chromatographie gazeuse – Détecteur à ionisation de flamme
GC-MS	Gas Chromatography – Spectrométrie de masse
GPD	Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxide d'hydrogène
HBA	Acide 4-hydroxybenzoïque
HBT	1-hydroxybenzotriazole
His	Histidine
IU	Unité Internationale
kDa	Kilo Daltons
LMS	Système laccase-médiateur
MES	Acide 4-morpholinoéthanesulfonique

M-Lip	Lipase bactérienne
MTBE	Methyl tertiary-butyl ether
NaN <sub>3</sub>	Azoture de sodium
PAH	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
PDB	Protein Data Bank
Phe	Phénylalanine
pNP	<i>para</i> -Nitro phénol
RB5	Noir réactif 5
RB19	Bleu réactif 19
RPM	Révolution par minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SLAC	Laccase de <i>Streptomyces coelicolor</i>
STSL	Laccase de <i>Streptomyces lavendulae</i> REN-7
Surf	Surfactant
Syr	Syringaldéhyde
T1, T2, T3	Type 1, 2 ou 3
TEMPO	4-acétamido-TEMPO
TMP	Pâte thermo-mécanique
TNT	2,4,6-trinitrotoluène
TSB	Tryptic soy broth
TvLac	Laccase de <i>Trametes versicolor</i>
UV	Ultra-violet
Wat (H <sub>2</sub> O)	Eau

## RÉSUMÉ

Mes travaux de doctorat ont porté sur le développement d'un système efficace d'expression de la laccase de *Streptomyces coelicolor* dans *Streptomyces lividans*. Ce système peut produire 350 mg L<sup>-1</sup> de cette laccase bactérienne avec un niveau de pureté élevé sans étape importante de purification. Ce niveau d'expression est le plus élevé jamais décrit dans la littérature pour une laccase bactérienne. Une caractérisation de l'enzyme a démontré qu'il s'agit d'une laccase alcaline qui est active sous une vaste gamme de pH, qui possède une bonne thermostabilité et qui est résistante à divers inhibiteurs traditionnels de cette enzyme. Dans le but de démontrer les applications potentielles de cette enzyme pour l'industrie du textile, nous avons vérifié son impact sur la décoloration de différentes encres. En seulement 10 min, elle a pu décolorer 94% de l'indigo carmine, 91% du bleu de Chicago et 65% du Reactive black 5 en présence de l'acétosyringone.

Nous avons également développé une solution enzymatique pour la réduction de la quantité de matières extractibles présentes dans la pâte thermomécanique et les eaux de procédés, cette approche biotechnologique a permis de contrôler le problème de la poix dans l'industrie papetière. Les résultats démontrent que par le biais d'une combinaison surfactant-lipase, nous avons obtenus une réduction de 48% du groupe des acides résiniques, 32% du groupe des stérols et 78% du groupe des triglycérides d'une pâte thermomécanique. En combinant ce traitement enzymatique de la pâte à une décontamination des eaux de procédés via une laccase, cette méthode devient une alternative efficace pour contrôler globalement le problème de la poix.

Mots-clés : Laccase, *Streptomyces coelicolor*, encre, décoloration, textile, lipase, poix du bois, pâte, triglycérides, acides résiniques, surfactant, médiateur.



## CHAPITRE I

### INTRODUCTION À LA LACCASE

#### 1.1 Origine et distribution des laccases

La laccase (EC 1.10.3.2, p-diphénol oxydase) fait partie des rares enzymes à avoir été étudiée au 19<sup>e</sup> siècle. Yoshida a été le premier à exposer cette enzyme en 1883 après l'avoir extrait de la souche *Rhus vernicifera*, un arbre originaire du Japon (Thurston, 1994; Levine, 1965). En 1896, la laccase fut décrite pour la première fois comme étant une enzyme d'origine fongique (Thurston, 1994; Levine, 1965). C'est une protéine largement distribuée dans la nature. On la retrouve dans plusieurs plantes et champignons (Leontievsky et al., 1997) ainsi que chez certaines bactéries (Diamantidis et al., 2000). Les laccases ont été identifiées chez des arbres, des pommes, des asperges, des pommes de terre, des poires et plusieurs autres variétés de légumes (Levine, 1965). Les laccases ont été isolées à partir de champignons de type ascomycètes, deutéromycètes et basidiomycètes (Assavanig et al., 1992). Les études démontrent qu'une souche de champignon peut exprimer plusieurs isoenzymes de laccase dépendamment des conditions de culture (Bollag et Leonowicz, 1984; Wahleitner et al., 1996; Palmieri et al., 1997; Farnet et al., 2000). Les champignons de type basidiomycètes, spécifiquement les pourritures blanches, ont été ciblés comme principaux responsables de la dégradation de la lignine dans la nature. Ils sont les champignons les plus efficaces et les plus étudiés dans ce domaine. *Trametes versicolor* est un exemple fréquemment étudié pour la dégradation de la lignine et la production de laccase (Figure 1.1) (Call et Mucke, 1997). Les enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont : la lignine peroxydase, qui catalyse l'oxydation

de composés phénoliques et non-phénolique, la manganèse peroxydase et la laccase, qui oxydent les composés phénoliques pour donner des radicaux de types phénoxy et quinones; la glucose oxydase et la glyoxal oxydase pour la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et la cellobiose-quinone oxydoréductase pour la réduction des quinones (Kirk et Farrell, 1987; Thakker et al., 1992). Les enzymes lignolytiques ont principalement été décrites comme étant extracellulaires mais il y a des évidences dans la littérature de l'occurrence de laccases intracellulaires dans les champignons de type pourritures blanches (Schlosser et al., 1997). Certaines d'entre-elles ont été identifiées chez la souche *Neurospora crassa* (Froehner et Eriksson, 1974).



**Figure 1.1** Photo de *Trametes versicolor*.

Dans les champignons elle la laccase joue un rôle dans divers procédés cellulaires, incluant la délignification, la sporulation et la production de pigments

(Thurston, 1994; Yaver et al., 2001). Par contre, seulement quelques unes de ses fonctions ont été démontrées expérimentalement. Ainsi, d'autres pourraient exister (Eggert et al., 1998).

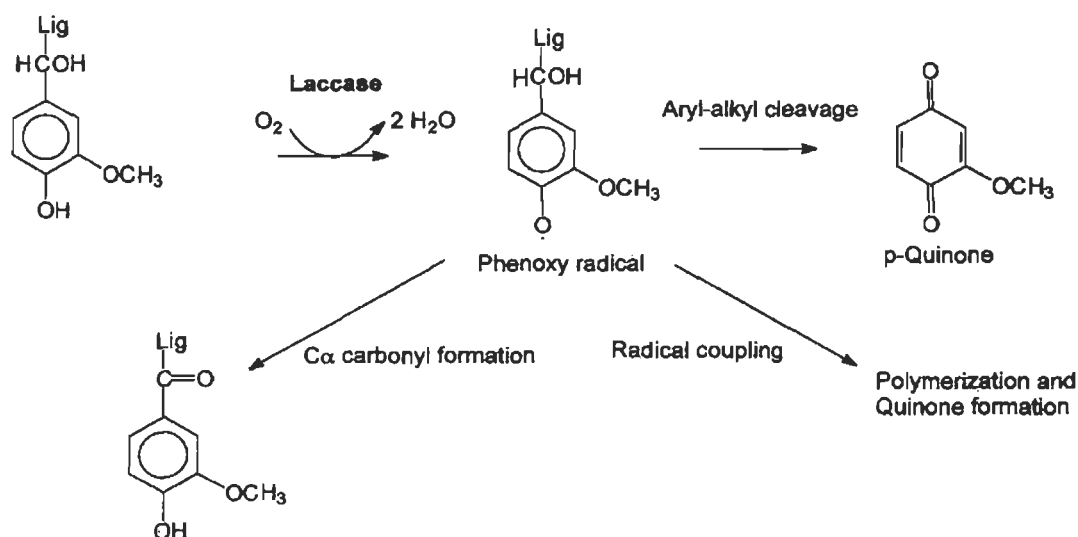
## 1.2 Classification et réactions enzymatiques des laccases

La laccase est incluse dans la famille des protéines « bleues » pourvues d'atomes de cuivres, une métalloprotéine faisant partie d'un groupe restreint d'enzymes. Ce groupe inclus d'autres enzymes telles que l'ascorbate oxydases, une protéine végétale, et la ceruloplasmine, une protéine de mammifère (Thurston, 1994; Xu, 1996; Ducros et al., 1998). Cette oxydase catalyse l'oxydation d'un électron et attaque un large spectre de différents substrats phénoliques. Pour ce type d'enzyme, l'oxygène moléculaire est utilisé en tant qu'accepteur d'électron et est ainsi réduit en deux molécules d'eau (Ducros et al., 1998). Cette réaction enzymatique génère subséquemment des radicaux libres. Étant donné que la réaction d'oxydation d'un électron présent dans le substrat est couplée à la réduction électronique de l'oxygène, le mécanisme d'action n'est pas direct (Thurston, 1994). Le produit initial est typiquement instable et peut ainsi subir une seconde oxydation enzymatique ou une réaction non-enzymatique comme une hydratation ou une polymérisation. Un exemple d'oxydation catalysée par la laccase est présenté à la Figure 1.2. Leonowicz et al. (1985) ont utilisés des lignosulphonates pour démontrer que les laccases avaient l'habileté de polymériser et de dépolymériser certains substrats. Les produits catalysés par la réaction enzymatique entraînent fréquemment une réaction de polymérisation via un appariement par oxydation. L'appariement de ces produits fut le résultat d'un couplage entre le C-O et le C-C de substrats phénoliques et entre N-N et le C-N pour les composés aromatiques aminés (Medvedeva et al., 1995; Hublik et Schinner, 2000).

La laccase fait également partie d'une plus grande famille d'enzymes : les polyphénols oxydases. Les polyphénols oxydases sont aussi des protéines cuivrées

ayant en commun le fait qu'elles sont capables d'oxyder des composés aromatiques avec l'oxygène moléculaire comme accepteur terminal d'électron (Mayer, 1987). Elles sont associées à trois types d'activités enzymatiques :

1. Catéchol oxydase ou *o*-diphénol: oxydoréductase utilisant l'oxygène (EC 1.10.3.1);
2. Laccase ou *p*-diphénol: oxydoréductase utilisant l'oxygène (EC 1.10.3.2);
3. Crésolase ou monophénol monooxygénase (EC 1.18.14.1).



**Figure 1.2** Oxydation de groupes phénoliques de la lignine par la laccase (tiré de Archibald et al., 1997).

Ces diverses enzymes peuvent donc être différenciées sur la base de leur spécificité au substrat (Walker et McCallion, 1980). Cependant, on a de la difficulté à définir la laccase selon sa spécificité au substrat à cause d'un chevauchement de substrats attaqués également avec la tyrosinase. La catéchol oxydase ou tyrosinase possède une activité *o*-diphénol autant que crésolase (oxydation de la L-tyrosine). En comparaison, la laccase possède une activité ortho et paradiphénol, avec une affinité

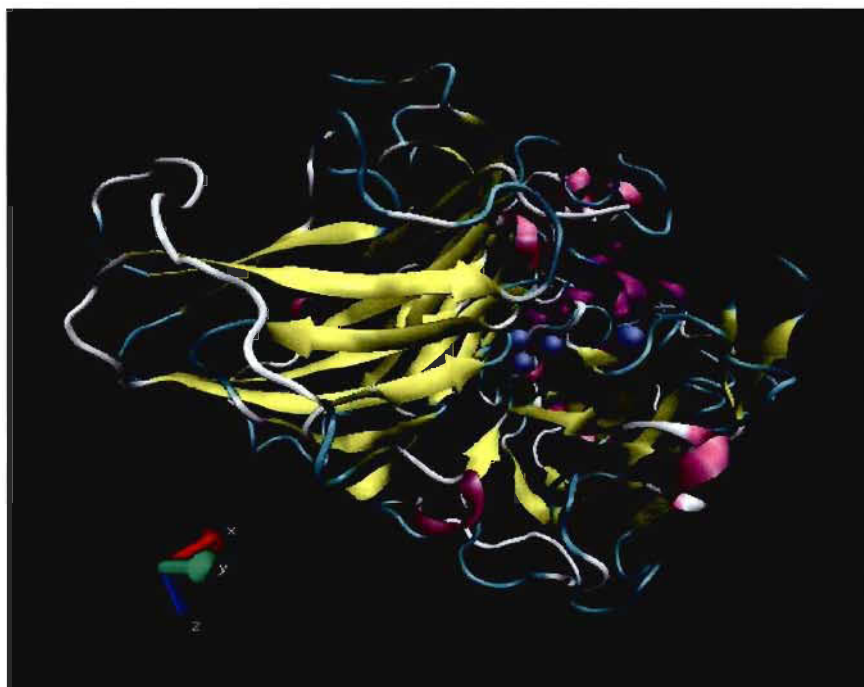
généralement supérieure pour le second groupe. Seules les tyrosinases possèdent une activité crésolase et seules les laccases ont l'habileté d'oxyder le syringaldazine (Thurston, 1994; Eggert et al., 1996). Il n'y a seulement qu'une mention dans la littérature d'une enzyme possédant à la fois l'activité tyrosinase et laccase (Sanchez-Amat et Solano, 1997).

La seconde difficulté pour définir la laccase selon sa spécificité au substrat est le fait que la spécificité de ces enzymes varie beaucoup d'un organisme à l'autre. Thurston (1994) a mentionné que l'hydroquinone et le catéchol sont de bons substrats pour la laccase mais que le guaiacol et le 2,6-diméthoxyphénol (DMP) sont souvent meilleurs, mais pas toujours. Le paraphénylenediamine est un substrat commun et le syringaldazine est un substrat unique à cette enzyme. Donc, la laccase oxyde les polyphénols, méthoxyphénols, les diamines et une vaste gamme d'autres composés (Thurston, 1994). Cependant, la laccase de *Cerrena unicolor* et de *Trametes versicolor* oxyde les phénols mais à divers degrés. La laccase de *Cerrena unicolor* oxyde mieux les para-phénols (Filazzola et al., 1999) alors que celle de *Trametes versicolor* oxyde mieux les ortho-phénols (Jolivald et al., 1999). D'autres types de réactions de catalyse, par le biais de laccases fongiques, ont été relatés dans la littérature. Une étude comparative concernant les propriétés de ces laccases a aussi indiquée que toutes ces enzymes étaient habilitées à oxyder les acides méthoxyphénoliques mais à divers degrés. L'étude a également démontrée que l'efficacité d'oxydation des substrats, par les différentes laccases, était dépendante du pH (Bollag et Leonowicz, 1984).

### 1.3 Caractérisation des laccases

Les laccases sont des protéines globulaires cuivrées monomériques ou multimériques (Figure 1.3). La laccase de *Podospora anserina* est un bon exemple d'une laccase multimérique (Thurston, 1994). Elle possède une structure tetramérique composée de sous-unités identiques. Une laccase typique possède une masse

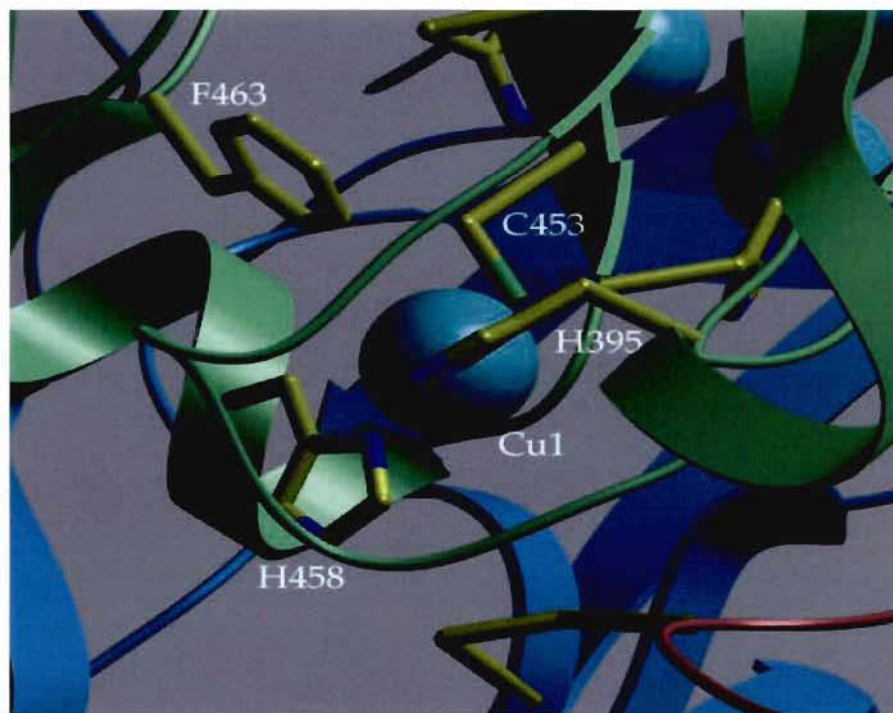
moléculaire variant entre 60 et 80 kDa et est glycosylée à 15-20% (Thurston, 1994; Luisa et al., 1996). Par contre, il y a des exceptions comme les laccases de *Monocillium indicum* (100 kDa), *Agaricus bisporus* (100 kDa), et *Aspergillus nidulans* (110 kDa) (Thakker et al., 1992; Perry et al., 1993; Thurston, 1994).



**Figure 1.3** Vue tridimensionnelle de la cristallographie de laccase II de *Trametes versicolor*. Les atomes de cuivre sont affichés sous forme sphérique et les structures secondaires de la protéine sont affichées en ruban (Créé à partir de PDB id : 1GYC).

La laccase contient également 4 atomes de cuivre par molécule monomérique et elle est subdivisée en trois domaines (Ducros et al., 1998). Trois types d'atomes de cuivre peuvent être identifiés en utilisant la spectroscopie UV/visible et la résonance électroparamagnétique (EPR). L'atome de cuivre de type 1 est responsable de la couleur bleue de la protéine sous une absorbance de 600 nm et il est détectable par l'EPR. Celui de type 2 ne confère aucune couleur mais il est détectable par l'EPR et le type 3 est constitué de la paire d'atomes de cuivre restants, atomes de cuivre qui

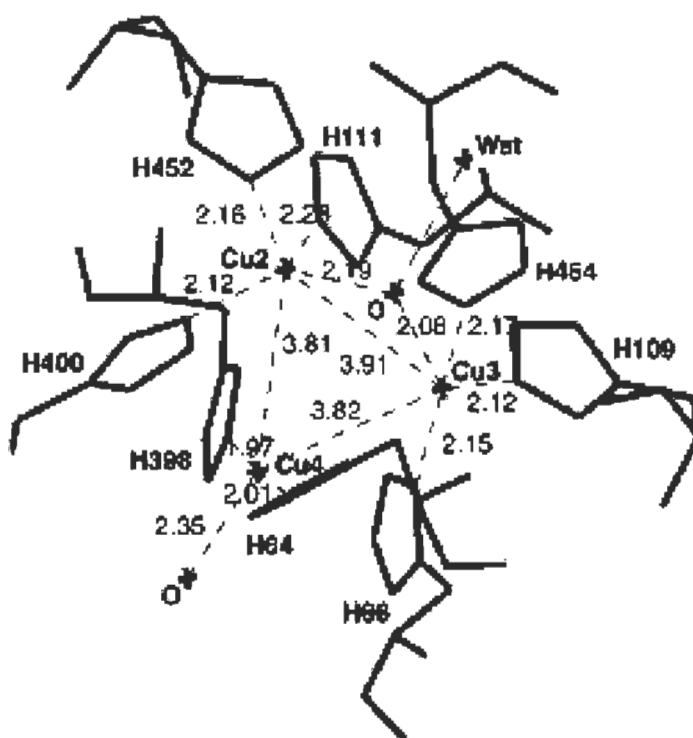
donnent une faible absorbance sous UV mais qui ne sont pas détectable par l'EPR (Thurston, 1994). Le site du cuivre de type 1 est présent sous forme Cu(II) lorsque l'enzyme est au repos (Ducros et al., 1998). Ce site est généralement coordonné par le biais de deux azotes reliés à deux imidazoles d'histidines et d'un soufre relié à une cystéine (figure 1.4). La géométrie du site est décrite comme étant tordue, triangulaire et bipyramidale avec une position axiale inoccupée où le substrat peut être attaché (Ducros et al., 1998). Un autre acide aminé peut être présent dans cette zone mais il est généralement trop éloigné pour directement coordonner l'atome de cuivre. L'atome de cuivre de type 1 est donc seulement lié par trois acides aminés (Ducros et al., 1998).



**Figure 1.4** Vue rapprochée du site du cuivre de type T1 de *Trametes versicolor*. L'atome de cuivre est affiché comme une large sphère et la structure de base de la protéine est affichée en ruban. Les acides aminés liant l'atome de cuivre, ainsi que l'acide aminé Phe463, sont affichés en bâtonnets (Tiré de Piontek et al., 2002).



Les atomes de cuivre du site T2/T3 sont disposés sous la forme d'un centre trinucléaire. Ces atomes sont liés par huit histidines fixées selon un motif His-X-His. Les deux atomes de cuivre T3 sont coordonnés à six histidines alors que le cuivre T2 est lié par les histidines restantes (Figure 1.5) (Ducros et al., 1998).



**Figure 1.5** Vue rapprochée du site des cuivres de type T2/T3 de *Trametes versicolor*. Les liens atomiques sont affichés en traits pointillés et les distances sont mesurées en Angstrom. (O) Oxygène (Wat) H<sub>2</sub>O (Tiré de Piontek et al., 2002).

Les séquences génétiques de diverses laccases ont démontré que les 10 histidines et la cystéine, liant les atomes de cuivre, sont conservées dans toutes les séquences étudiées jusqu'à présent à l'exception de celle d'*Aspergillus nidulans* qui possède une méthionine liant le cuivre de type 1 (Leontievsky et al., 1997). Ces acides aminés servent de système de transport d'électrons à partir du site de cuivre T1, où les électrons sont extraits de composés phénoliques, et redirigés vers le centre



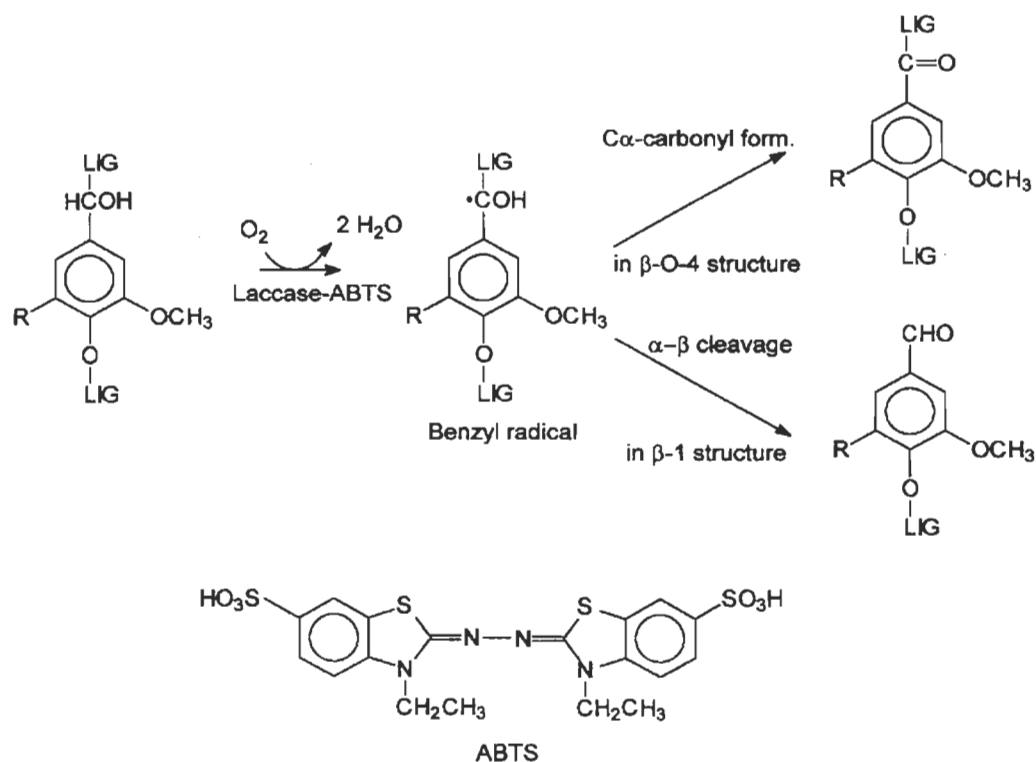
trinuéaire où le dioxygène est lié et sera réduit par ces électrons (Ducros et al., 1998). Cependant, la nature exacte du mécanisme de réaction engendrant la réduction du dioxygène en eau, ainsi que celui concernant le transfert électronique par le biais de l'oxydation des substrats phénoliques, demeure controversé (Ducros et al., 1998).

#### 1.4 Le système laccase-médiateur

La gamme des substrats attaquant par les laccases a pu être élargie par l'introduction de composés phénoliques agissant comme médiateurs entre l'enzyme et le substrat à dégrader. Ce nouveau système a ouvert la porte à la possibilité d'utiliser la laccase pour oxyder des composés non-phénoliques, comme ceux présents dans la lignine de la pâte à papier kraft, qui ne pouvaient être attaqués auparavant sans médiateurs (Bourbonnais et Paice, 1990). Le système laccase-médiateur (LMS) a été premièrement développé pour obtenir une alternative à l'utilisation du chlore pour le blanchiment de la pâte à papier (délignification) et fut originellement décrit par Bourbonnais et Paice (1990) avec l'utilisation de l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) comme médiateur. Les laccases jouent un rôle dans la dégradation de la lignine mais ce phénomène est restreint aux composés phénoliques à cause de leur faible potentiel d'oxydation (Reid et Paice, 1994). L'utilisation de ces enzymes en présence de médiateurs a permis d'augmenter leur potentiel d'oxydation et ainsi l'oxydation de composés non-phénoliques de la lignine (Figure 1.6). L'utilisation du système laccase-médiateur sur de la pâte kraft a permis la réduction de l'indice kappa (indice de délignification), la déméthylation et dépolymérisation de la lignine (Paice et al., 1995a; Archibald et al., 1997; Reid et Paice, 1994). L'activité de cette méthode envers la lignine est dépendante de deux facteurs principaux : le potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme ainsi que la stabilité et la réactivité du radical libre résultant de l'oxydation du médiateur.

Le système laccase-médiateur a également été appliqué à l'oxydation d'éthers aromatiques de type méthyl, d'alcool benzylique (Johannes et al., 1998) et

d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (Johannes et al., 1998; Majcherczyk et al., 1998; Johannes et Majcherczyk, 2000). Plusieurs de ces composés correspondent similairement à d'autres sélectionnés par l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA-USA) et d'autres institutions nationales comme étant des composés relativement toxiques. Ce système a permis de dégrader certains composés tels que l'acénaphthylène, l'anthracène benzo(a)pyrène acénaphthène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène et le pérylène (Collins et al., 1996; Majcherczyk et al., 1998; Johannes et al., 1998). De plus, l'industrie du textile utilise également le système



**Figure 1.6** Oxydation de groupes non-phénoliques de la lignine par le biais du système laccase-ABTS (tiré de Archibald et al., 1997).

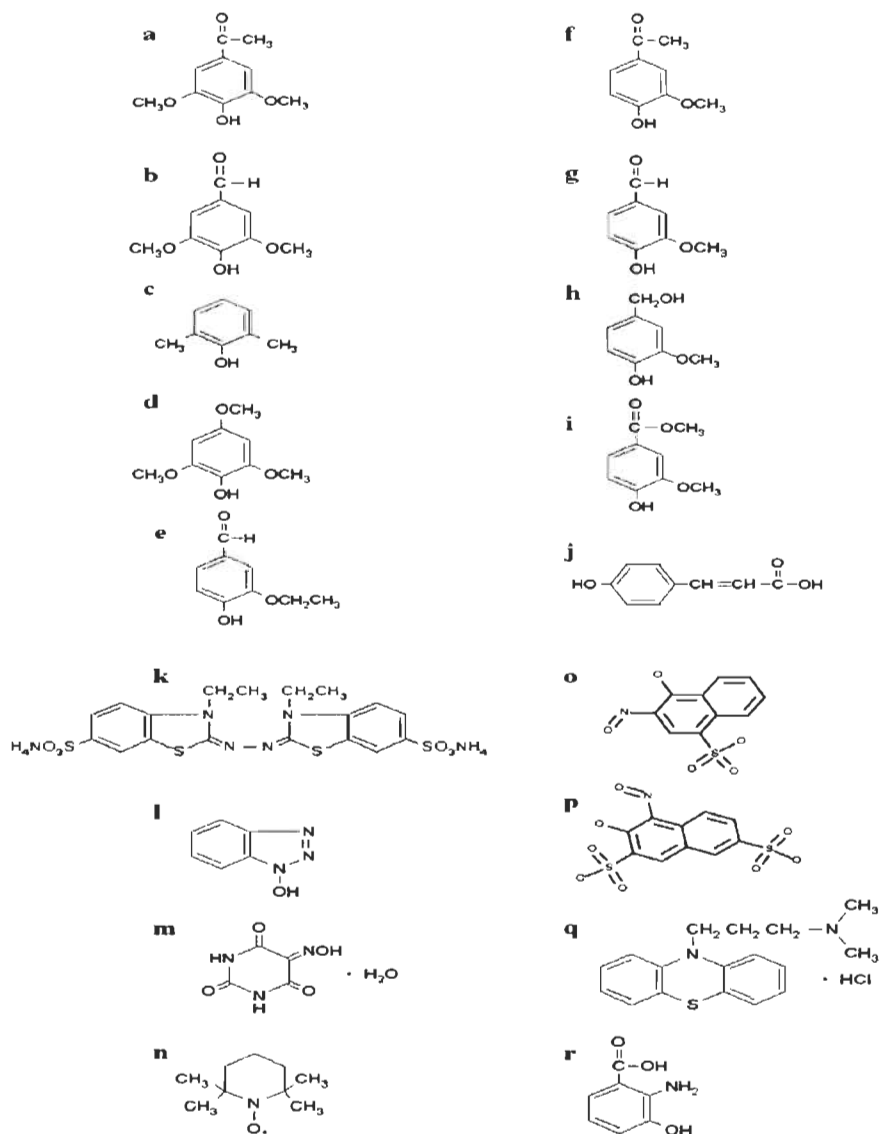
laccase-médiateur pour la décoloration d'eaux usées (Hardin et al., 2000) et la décoloration du denim (Tiré du site internet de Novozyme, Danemark et du site internet de Zylite, Inde).

Il a également été démontré que les laccases de divers organismes réagissent différemment avec divers médiateurs et différents substrats (Bourbonnais et al., 1997). Il est donc essentiel que diverses laccases et différents médiateurs soient investigués. Un nombre important de différents médiateurs potentiels a été décrit pour le système laccase-médiateur (Figure 1.7), mais l'ABTS et le HBT (1-hydroxybenzotriazole) demeurent les plus utilisés dans la littérature (Bourbonnais et al., 1997; Johannes et Majcherczyk, 2000). D'autres études ont démontré l'utilisation de médiateurs naturels tels que le phénol, l'aniline, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'alcool 4-hydroxybenzylique. L'utilisation de ces médiateurs peut être aussi efficace que l'ABTS ou le HBT (Johannes et Majcherczyk, 2000). Une autre méthode utilisant la laccase et des complexes de métaux de transition a été décrite par Bourbonnais et al. (2000) pour la délignification de pâte à papier. L'avantage de cette méthode, comparativement à celles utilisant l'ABTS ou le HBT, est la possibilité de recycler les complexes métalliques dans le procédé.

## 1.5 Applications biotechnologiques des laccases

### 1.5.1 Applications dans l'industrie du textile

Les deux tiers du marché mondial des encres est lié à l'industrie du textile (Riu et al., 1998). Cette industrie utilise de grandes quantités d'eau et de produits chimiques dans ses procédés (Mishra et Tripathy, 1993; Banat et al., 1996; Juang et al., 1996). À cause de leur structure chimique, les encres sont très résistantes à la



**Figure 1.7** Structure chimique de 10 différents médiateurs naturels (a à j) et 7 différents médiateurs synthétiques (k à r) pour la laccase. (a) Acétosyringone (b) syringaldéhyde (c) 2,6-diméthylphénol (d) 2,4,6-triméthoxyphénol (e) 3-*o*-éthyl vanilline (f) acétovanillone (g) vanilline (h) alcool de vanillyle (i) méthyl vanillate (j) acide *p*-coumarique (k) ABTS (l) HBT (m) acide violurique (n) 2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-1-oxyl (o) acide 2-nitroso-1-naphthol-4-sulfonique (p) acide 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonique (q) promazine (r) acide 3-hydroxyanthranilique (tiré de Camarero et al., 2005).

dégradation et la plupart sont difficiles à décolorer (Poots et McKay, 1976; McKay, 1979). Il y a de plus en plus de préoccupations au niveau de la santé humaine, car certaines encres sont créées à partir de composés aromatiques cancérigènes tel que la benzidine (Baughman et Perenich, 1988). La plupart des procédés de traitements des eaux usées textiles sont peu efficaces et coûteux (Cooper, 1995; Stephen, 1995). Ainsi, le développement de procédés enzymatiques, à base de laccase, est une solution attrayante étant donné les capacités de cette enzyme à dégrader diverses structures chimiques similaires aux encres employées dans cette industrie (Abadulla et al., 2000; Blánquez et al., 2004; Hou et al., 2004; Rodríguez Couto et al., 2004a; Rodríguez Couto et al., 2005b).

Tel que mentionné précédemment, l'industrie du textile utilise également le système laccase-médiateur pour la décoloration d'eaux usées (Hardin et al., 2000) et du denim. Quelques produits commerciaux sont déjà disponibles sur le marché. Par exemple, le Denilite I a été lancé sur le marché par Novozymes en 1996. Il s'agit du premier produit commercial, basé sur le système laccase-médiateur, à avoir été mis sur le marché. Depuis, une version améliorée a été lancée sur le marché, le Denilite II (tiré du site internet de Novozyme). En 2001 un produit similaire, le Zylite de Zytex (tiré du site internet de Zylite), a également été mis sur le marché.

### 1.5.2 Applications dans l'industrie de l'alimentation

Les laccases peuvent aussi être utilisées dans certains procédés alimentaires pour améliorer ou modifier l'apparence de la couleur de la nourriture et/ou des boissons ainsi que pour traiter les composés phénoliques des effluents industriels. Par exemple, la laccase est utilisée dans l'élimination de composés phénoliques indésirables, responsable du brunissement, de la turbidité dans certains jus de fruits, bières et vins (Mathiasen, 1996; Mayer et Staples, 2002; Georis et al., 2003). Elles sont aussi utilisées dans la cuisson de certains aliments à cause de leur capacité à

créer des liens entre certains biopolymères. Elle peuvent ainsi augmenter la résistance maximale et diminuer l'élasticité d'une pâte de gluten par exemple (Selinheimo et al., 2006).

### 1.5.3 Applications dans l'industrie papetière

La production de papiers requière la séparation et la dégradation de la lignine présente dans la pâte de bois. Dans un contexte de développement durable, il est nécessaire de remplacer les technologies de blanchiment polluantes basées sur l'utilisation du chlore (Kuhad et al., 1997). La délignification à l'oxygène a été introduite dans l'industrie en réponse à cette demande (Carter et al., 1997). Par contre, un prétraitement de la pâte avec des enzymes lignolytiques s'avère une stratégie de délignification propre et spécifique, ayant ainsi moins d'impacts négatifs sur la dégradation de la cellulose (Kuhad et al., 1997). Plusieurs études ont été effectuées à ce sujet et peu de traitements enzymatiques ont démontré une efficacité de délignification ou blanchiment qui puisse faire compétition aux traitements chimiques actuels (Bajpai, 1999; Kenealy et al., 2003). Le système laccase-médiateur démontre cependant un fort potentiel pour le bioblanchiment de la pâte de bois et le procédé Lignozym est un bon exemple de développement technologique pour ce type d'application particulière (Call et Mücke, 1997).

Le problème de la poix (pitch) est un des facteurs les plus importants limitant l'efficacité et la productivité des industries papetières productrices de pâte mécanique. Ces matières extractibles colloïdales ont tendance à s'agglomérer et à se redéposer sur les fibres de la pâte à papier. Cette agglomération affecte ainsi la qualité du papier et entraîne des pertes économiques importantes pour l'industrie papetière. La laccase a démontré un potentiel significatif dans l'enlèvement de ces composés de la pâte à papier et des eaux usées de procédé (Zhang et al., 2005).

L'habileté de la laccase à former des radicaux libres de lignine peut aussi être utilisée dans la modification des fibres de bois. Par exemple, la laccase peut être

utilisée pour l'amélioration de l'adhésion des fibres de matériaux lignocellulosiques tel que les panneaux de fibres de bois. Il a été démontré que l'utilisation de laccase, dans ce type de procédé, permettait d'améliorer les propriétés mécaniques des panneaux tout en diminuant l'utilisation de composés adhésifs toxiques (Felby et al., 1997; Hüttermann et al., 2001).

Une autre possibilité est l'amélioration des propriétés chimiques et physiques de produits à base de fibres de bois par le biais du greffage de composés lignocellulosiques (Mai et al., 2000). Des études préliminaires ont démontré que les laccases peuvent greffer divers composés phénoliques à la surface des fibres de pâte kraft (Lund et Ragauskas, 2001; Chandra et Ragauskas, 2002), permettant ainsi l'amélioration de certaines de ses propriétés physiques.

#### 1.5.4 Décontamination des sols

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ainsi que d'autres composés xénobiotiques, sont une source de contamination majeure et leur dégradation est d'une importance capitale pour l'environnement. Les propriétés catalytiques des laccases peuvent être utilisées pour dégrader ces composés. Par exemple, des hydrocarbures aromatiques polycycliques provenant de dépôts d'huile naturelle et de l'utilisation de pétrole ont été dégradés par la laccase (Pointing, 2001). Il a été également démontré que les laccases sont capables de détoxifier des résidus de munitions composés de 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) (Durán et Esposito, 2000).

#### 1.5.5 Applications dans l'industrie des cosmétiques

Le monde des cosmétiques utilise également la laccase dans certains de ses produits. Par exemple, la laccase est utilisée comme agent oxydant dans certains produits de formulation de colorants pour cheveux. La laccase remplace ainsi le peroxyde d'hydrogène dans ce type de produit et rend ainsi ce dernier moins irritant

(Roure et al., 1992; Aaslyng et al., 1996; Lang et Cotteret, 1999). Plus récemment, la laccase a été utilisée dans des préparations dermatologiques contenant des protéines pour éclaircir la couleur de la peau (Golz-Berner et al., 2004).

#### 1.5.6 Biosenseurs

Étant donné que les laccases sont capables de catalyser des réactions de transfert électronique sans l'ajout de cofacteur additionnel, leur utilisation a été évaluée dans des biosenseurs pour la détection de divers composés phénoliques, de l'oxygène et des azotures (Haghighi et al., 2003). De plus, des biosenseurs pour la détection de certaines drogues ont aussi été développés (Bauer et al., 1999; Lisdat et al., 1997; Leite et al., 2003; Ferry et Leech, 2005).

#### 1.5.7 Synthèse organique

Les laccases ont aussi un grand intérêt en synthèse organique où elles peuvent être utilisées dans diverses applications d'oxydation (Semenov et al., 1993; Uyama et Kobayashi, 2002; Nicotra et al., 2004) ainsi que dans la production de polymères et d'agents médicaux (Xu, 1999; Kurisawa et al., 2003;). La laccase a également été utilisée pour la synthèse de colorants phénoliques (Mustafa et al. 2005).



## CHAPITRE II

### ARTICLE SCIENTIFIQUE 1

#### 2.1 Résumé

L'absence d'une laccase robuste et abordable est une barrière importante empêchant l'utilisation de cette enzyme dans divers secteurs industriels. En utilisant un système d'expression efficace développé dans *Streptomyces lividans*, nous avons produit 350 mg L<sup>-1</sup> de la laccase bactérienne de *Streptomyces coelicolor* avec un niveau de pureté élevé sans étape importante de purification. Ce niveau d'expression est le plus élevé jamais décrit dans la littérature pour une laccase bactérienne. Cette enzyme sécrétée peut oxyder divers substrats dans un vaste intervalle de pH : 4,0 pour le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) et 9,0 pour le 2,6-diméthoxyphénol. De plus, cette laccase bactérienne a la particularité d'être stable dans différentes conditions. Elle est stable dans un pH de 3,0 à 9,0, elle possède une bonne thermostabilité à 70°C et une résistance élevée envers certains inhibiteurs conventionnels des laccases. En comparaison, la laccase de *Trametes versicolor* est complètement inhibée en présence de 1mM d'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>), tandis que la laccase de *S. coelicolor* ne démontre aucune perte d'activité dans ces mêmes conditions. Dans le but de démontrer les applications potentielles de cette enzyme, nous avons vérifié son impact sur la décoloration de l'indigo carmine. Cette enzyme a été capable de rapidement décolorer cette encre en présence d'un médiateur naturel, soit le syringaldéhyde.

## 2.2 Présentation de l'article et contribution des auteurs

Homologous cloning, expression and characterization of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourization of an indigo dye.

Etienne Dubé, François Shareck, Yves Hurtubise, Claude Daneault et Marc Beauregard\*

E. Dubé, Y. Hurtubise et C. Daneault

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

F. Shareck

INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Ville de Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

M. Beauregard (\* Corresponding author)

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, e-mail:

[marc.beauregard@uqtr.ca](mailto:marc.beauregard@uqtr.ca), Phone: +1(819)376-5011 ext.: 3354; Fax: +1(819)376-5084

Contribution des auteurs : M. Etienne Dubé est le principal auteur de cette étude et la majeure partie des travaux de recherche ont été effectués par lui. M. François Shareck est un collaborateur externe qui a participé au développement du système d'expression de la laccase. M. Yves Hurtubise est un collaborateur privé qui a participé au développement du système d'expression de la laccase. Il est le directeur R&D de la compagnie AgroTerra Biotech. M. Claude Daneault est le directeur de recherche et M. Marc Beauregard est le codirecteur de recherche.

# Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye

Etienne Dubé · François Shareck · Yves Hurtubise ·  
Claude Daneault · Marc Beauregard

Received: 6 December 2007 / Revised: 13 March 2008 / Accepted: 28 March 2008 / Published online: 24 April 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** The lack of a commercially available robust and inexpensive laccase is a major barrier to the widespread application of this enzyme in various industrial sectors. By using an efficient system developed in *Streptomyces lividans*, we have produced by homologous expression 350 mg L<sup>-1</sup> of a bacterial laccase with a high purity and without any extensive purification. This is the highest production yield reported in the literature for a bacterial laccase. The secreted enzyme achieved oxidation under a wide pH range depending on the substrate: 4.0 for 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) and 9.0 for 2,6-dimethoxyphenol. Furthermore, this bacterial laccase was found to be quite resistant under various conditions. It withstands pH from 3.0 to 9.0, shows a great thermostability at 70°C and was highly resistant toward conventional inhibitors. For instance, while the laccase of *Trametes versicolor* was completely inhibited by 1 mM NaN<sub>3</sub>, the laccase of *Streptomyces coelicolor* was fully active under the same conditions. To assess application potential of this laccase, we have investigated its ability to decolourise Indigo carmine. This enzyme was able to rapidly decolourise the dye in the presence of syringaldehyde as a redox mediator.

**Keywords** Laccase · *Streptomyces coelicolor* · Homologous cloning · Expression · Characterisation · Dye decolourisation · Textile

## Introduction

The first laccase studied was from *Rhus vernicifera* in 1883, a Japanese lacquer tree, from which the designation laccase was derived (Yoshida 1883). Laccases are defined in the Enzyme Commission nomenclature as oxidoreductases acting on diphenols and related substances using molecular oxygen as acceptor (EC 1.10.3.2). They are multicopper proteins found mostly in plants and fungi but also in some bacteria (Alexandre and Zhulin 2000; Claus 2004; Sharma et al. 2007). The protein structure acts as an intricate ligand for the catalytically active coppers, providing them with a coordination sphere where changes between the reduction states are thermodynamically possible. They contain at least one type-1 copper, which is associated to the oxidation site, and typically harbour at least three additional coppers: one type-2 and two type-3 coppers arranged in a trinuclear cluster. This cluster is associated to the site where reduction of molecular oxygen occurs (Bertrand et al. 2002; Hakulinen et al. 2002; Piontek et al. 2002; Enguita et al. 2003).

Laccases are of particular interest with regard to various commercial applications because of their ability to oxidise a wide range of relevant substrates. Thus, research is being carried out in various fields of interest: textile, pulp and paper, food and cosmetics industries, as well as in bioremediation, biosensor, biofuel and organic synthesis applications (Mayer and Staples 2002; Burton 2003; Kenealy and Jeffries 2003; Claus 2004; Rodriguez Couto et al. 2006; Minussi et al. 2007). Few commercialised

E. Dubé · Y. Hurtubise · C. Daneault · M. Beauregard (✉)  
Département de chimie-biologie,  
Université du Québec à Trois-Rivières,  
3351 Des Forges, C.P. 500,  
Trois-Rivières, Quebec, Canada, G9A 5H7  
e-mail: marc.beauregard@uqtr.ca

F. Shareck  
INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec,  
531 boul. des Prairies,  
Ville de Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7

laccase products are already available: Denilite I and II from Novozymes (Denmark) and Zylite from Zytex (India), to name a few. These products are used in the textile industry for denim bleaching. Usually, mediators are used with laccase in order to optimise the process. Once oxidised by the enzyme, these molecules act as electron scavengers and attack the dye, which results in bleaching in the end (Camarero et al. 2005; Moldes and Sanroman 2006).

The majority of laccases characterised so far were derived from lignin-degrading fungi (Leonowicz et al. 2001). However, laccases are also widespread in the prokaryotic kingdom, and a surprisingly limited amount of relevant information has been published (Alexandre and Zhulin 2000; Claus 2004; Sharma et al. 2007). One of the most studied bacterial laccase so far is CotA, an endospore coat component of *Bacillus subtilis* (Hullo et al. 2001; Martins et al. 2002; Enguita et al. 2003). Bacterial laccases like CotA or the one from *Streptomyces lavendulae* REN-7 (STSL) were found to have the highest thermal stability of all laccases studied (Martins et al. 2002; Suzuki et al. 2003). Despite such stability and the numerous advantages prokaryotic enzyme production may offer over eukaryotic production, industrial use of bacterial laccase is still not viable because it is limited by extremely low production yield (Martins et al. 2002; Endo et al. 2003; Suzuki et al. 2003). Improvement of production yield would have a tremendous impact on laccase application in a wide array of applications, including dye decolourisation.

Recently a laccase was found in *Streptomyces coelicolor*, a Gram-positive soil bacteria, and partially characterised (Machczynski et al. 2004). Despite its low redox potential and the low expression yield reported, this enzyme displays interesting features: it has a relatively small size (~32 kDa) and a high activity under alkaline pH (Machczynski et al. 2004). On the contrary, many known fungal laccases are mostly active under acidic pH (Sharma et al. 2007). *S. coelicolor* laccase might prove to efficiently oxidise phenolic compounds under alkaline conditions and be developed into viable product for the textile industries.

In this report, we have cloned and isolated the laccase gene of *S. coelicolor* to investigate its potential uses for industrial applications. Because bacterial laccases are notoriously difficult to express (Martins et al. 2002; Endo et al. 2003; Suzuki et al. 2003), the primary objective of this work was to focus on the development of an efficient prokaryotic production system in *Streptomyces*. This is one of the major obstacles for future profitable industrial applications with laccase (Rodriguez Couto et al. 2006). Because there is little information on the laccase of *S. coelicolor*, we also wanted to characterise this enzyme further to determine its range of activity and stability under different conditions (pH and temperature) as well as its resistance to various inhibitors. Finally, the enzyme was

tested for the decolourisation of an indigo dye, in a way to assess its applicability in textile industry.

## Materials and methods

### Substrates and chemicals

Unless specified otherwise, all substrates and chemicals were of analytical grade or better and purchased from Sigma-Aldrich.

### Organisms and vectors

*Streptomyces lividans* IAF10-164 (msiK<sup>-</sup>), a xylanase- and cellulase-negative mutant, served as host strain for the recombinant plasmid (Hurtubise et al. 1995). Plasmid pIAFD95A was used for gene expression (Gift of F. Shareck).

### Cloning of the laccase gene

The coding sequence for the laccase of *S. coelicolor* A3(2) was available from Genbank (accession number CAB45586). The structural gene was amplified from total DNA of *S. coelicolor* A3(2) by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: 5-GAAACGCATGCACAGGCGAG-GCTTTAACCG-3 (F) and 5-CCTGGAGCTCAGTGCTCGTGTTC-GTGTGCG-3 (R). The forward primer (F) introduced a *Sph*I site (underlined) on the start codon (italic) and the reverse primer (R) introduced a *Sac*I (underlined) after the stop codon (italic). The amplification product was digested with *Sph*I–*Sac*I and cloned into plasmid pIAFD95A. Protoplasting, transformation of the mutant IAF10-164 and spore preparations, was performed as described by Kieser et al. (2000). Screening of *Streptomyces* transformants was carried out using the colony-PCR technique (Ward 1992). DNA extracts were sequenced and analysed with an ABI Prism 3100 to confirm the sequence of the cloned gene.

### Culture conditions

The strain was maintained on a 7-day-old fresh Bennett agar containing a modified yeast-extract malt-extract medium, in which 0.4% maltose was substituted for glucose. Spore suspensions prepared from such slants were used as inocula for vegetative cultures in 100-mL trypticase soy broth (TSB) with glass beads. Incubation was carried out at 34°C on a rotary shaker at 240 rev./min for a period of 24 h. Enzyme production was carried out in 1 L Erlenmeyer flasks containing 80 mL of M<sub>14</sub> medium, as previously described by Kluepfel et al. (1990), using 1% (v/v) of D-

xylose as main carbon source. The flask cultures were incubated at 34°C on a rotary shaker at 240 rev./min for 72 h.

### Protein purification

The fermentation broth was recovered by centrifugation at  $11,000\times g$  for 30 min at 4°C. Prior to protein purification, the laccase supernatant was incubated overnight with 25  $\mu\text{M}$  of  $\text{CuSO}_4$  to restore the enzymatic activity. The supernatant was then filtered on a 0.2- $\mu\text{m}$  membrane to retain any floating particles and concentrated fivefold by ultrafiltration with an Amicon system (Millipore) using a 10-kDa cutoff membrane.

### Enzymatic activity and protein determination

Laccase activity was determined at 25°C using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) or 2,6-dimethoxyphenol (DMP) as the substrate. The oxidation of the substrate was detected by measuring the absorbance at 420 nm for ABTS ( $\epsilon=36,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Childs and Bardsley 1975) and at 470 nm for DMP ( $\epsilon=27,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Jaouani et al. 2005). The reaction mixture (300  $\mu\text{L}$ ) contained 5  $\mu\text{L}$  of appropriately diluted enzyme sample, 150  $\mu\text{L}$  of 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-glycine buffer (0.1 M, pH 4.0), 20  $\mu\text{L}$  of 60 mM ABTS or DMP and 125  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ . Activity was calculated in international unit which is the amount of laccase that oxidises 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per minute. The protein content was determined at 595 nm using the Pierce Coomassie Plus protein assay reagent (Bradford 1976) with bovine serum albumin as a standard. The absorbance was measured with a Multiskan Ascent spectrophotometer (Thermo Electron, Inc., USA). All the assays were performed in triplicate.

### Gel electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the protocol of Laemmli (1970) with NuSep precast 10% Tris-Tricine gel (NuSep, GA, USA), using a Mini-Protean II vertical electrophoresis system (Biorad, CA, USA). Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue and the molecular mass of the purified laccase was determined by the relative mobility of the Biorad silver-stained SDS-PAGE standards, low range, run alongside. Zymogram was performed by washing the native PAGE-unstained Tris-Tricine gel with Triton 1% for 30 min. The gel was stained afterward with ABTS (6 mM) in 50 mM MES-glycine buffer (pH 4.0) for 30 min at 37°C (Muñoz et al. 1997).

### Effect of pH and temperature on laccase activity and stability

The effect of pH on laccase activity was determined within a pH range of 3.0–11.0 using ABTS or DMP as the substrate in 50 mM MES-glycine buffer. Optimum temperature of the purified laccase was examined over the temperature range of 30–70°C with ABTS as the substrate at its optimal pH value. The effect of pH on the enzyme stability was investigated by measuring the remaining activity after incubation for 48 h at 30°C in 50 mM MES-glycine buffer (pH 3.0–11.0). Thermal denaturation of the enzyme was performed by measuring residual activity at 30°C after incubating the enzyme 10 min between 30°C and 100°C. The thermal stability of laccase was determined in 50 mM MES-glycine buffer (optimum pH) for 2 h at 70°C. All enzymatic assays were automated on a Biomek 2000 platform (Beckman-Coulter, Inc.) and performed in triplicate.

### Inhibitors effect on laccase activity

The effect of sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on laccase activity were determined after 10-min incubation of the enzyme with the inhibitors at 30°C. The assays were performed in triplicate.

### Dye decolourisation by laccase

The decolourisation of Indigo carmine by laccase was tested with and without syringaldehyde as mediator (60-mM solution prepared with ethanol). The reaction mixture (300  $\mu\text{L}$ ) contained 50-mM MES-glycine buffer (pH 9.0), dye (final concentration 25  $\mu\text{M}$ ), purified enzyme (100 mU) and mediator solution (final concentration 1 mM). Reactions were initiated by enzyme addition and incubated at 45°C for 60 min. Control samples were run in parallel with a deactivated enzyme (boiled for 20 min) under identical conditions. Dye decolourisation was determined by measuring absorbance at 595 nm (maximum wavelength of the dye) and expressed in percentage of decolourisation. Decolourisation assays were performed in triplicate.

## Results

### Cloning of the laccase gene from *S. coelicolor* in *S. lividans*

The structural laccase gene was amplified from *S. coelicolor* A3(2). The amplicon was inserted into the *Streptomyces* expression-secretion vector pIAFD95A between *Sph*I and *Sac*I sites, resulting in a 6.3-kb plasmid



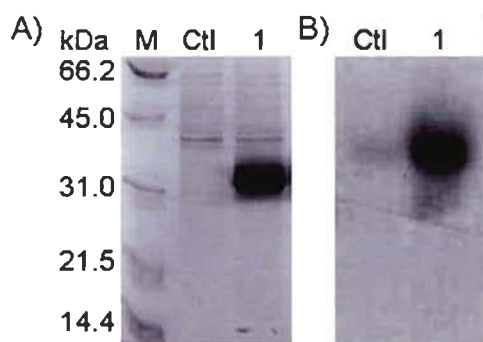
(pIAFD95A-SLAC). This vector had previously been constructed with the promoter of the *D95A* gene from the same organism (unpublished data). The resultant plasmid was transformed into *S. lividans* 10-164. Colony-PCR screening (Ward 1992) was applied to select the right clone constructions for further investigation. Sequence analysis showed that the DNA sequence of the laccase gene was 1,029 bp encoding a 343 amino acids protein identical to that of CAB45586. Good transformants were selected for the production of the recombinant protein using liquid cultures.

#### Expression of the laccase gene in *S. lividans*

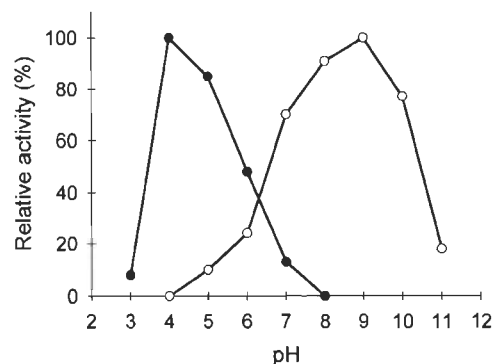
Laccase production was performed in shake flask liquid cultures grown in TSB or M<sub>14</sub> media. SDS-PAGE (Fig. 1a) and native gel (Fig. 1b) electrophoresis were performed to confirm protein expression and enzymatic activity from the transformants. The expression system produced laccase with a high purity yield (90–95%) without any additional purification steps. The molecular weight of the protein is around 32 kDa which corresponds to the one obtained by Machczynski et al. (2004). Laccase from *S. coelicolor* (named “SLAC”) was routinely produced with a high yield (350 mg L<sup>-1</sup>) and its specific activity was 8 U mg<sup>-1</sup> with ABTS. This is the highest production yield, for a bacterial laccase, reported in the literature.

#### Effect of pH on laccase activity and stability

The optimum pH of the enzyme was 4.0 for ABTS and 9.0 for DMP (Fig. 2). Such pH dependence varies from that of *Trametes versicolor* laccase (named “TvLac”, Sigma-Aldrich). This enzyme is optimally active at pH 4.0 for



**Fig. 1** SDS-PAGE (a) and native PAGE (b) analysis of laccase from *S. coelicolor*. **a** The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane M: SDS-PAGE standards; lane Ctl: culture supernatant without the plasmid C109-SLAC concentrated fivefold; lane 1: SLAC supernatant concentrated fivefold. **b** Activity staining with 6 mM ABTS in 50-mM MES-glycine buffer (pH 4.0). Lane Ctl: supernatant obtained from the same host without the plasmid C109-SLAC concentrated fivefold; lane 1: SLAC supernatant concentrated fivefold

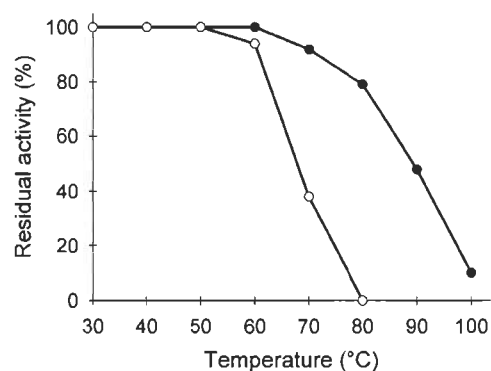


**Fig. 2** Effect of pH on the activity of SLAC. Activity was measured in the presence of 6 mM ABTS (closed circle) or DMP (open circle). Relative activity was normalised to the maximal activity achieved when using either substrate at the optimal pH

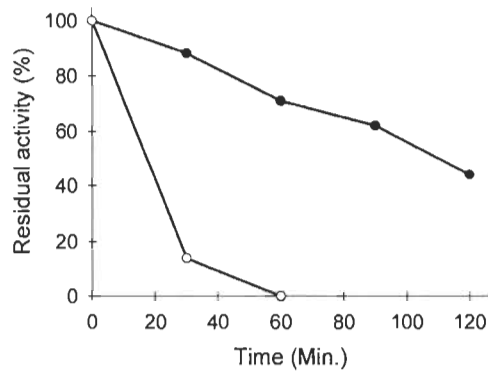
both ABTS and DMP under the same conditions (data not shown). SLAC conserved all its activity between pH 3.0 to 9.0 when it was incubated for 48 h at 30°C (data not shown). In comparison, TvLac conserved all its activity between pH 3.0 to 6.0 in the same conditions.

#### Effect of temperature on laccase activity and stability

At pH 4.0, the optimum temperature for SLAC was 60°C (data not shown). Thermal denaturation of SLAC and TvLac were studied by incubating the enzymes for 10 min at various temperatures. Under these conditions, SLAC was able to retain more than 90% of its initial activity up to 70°C, but TvLac was unstable when treated above 60°C (Fig. 3). Figure 4 shows the time course of SLAC and TvLac activity decline when incubated at 70°C. SLAC retained 90% of its initial activity for up to 25 min of treatment and had a half-life of 110 min. TvLac lost almost all its activity after 30 min. These results confirm SLAC superior thermostability in comparison to that of TvLac.



**Fig. 3** Effect of thermal denaturation of TvLac and SLAC. Residual activity (%) of TvLac (open circle) and SLAC (closed circle) was measured after 10-min incubation at different temperatures



**Fig. 4** Effect of temperature on stability at 70°C for TvLac and SLAC. Residual activity (%) of TvLac (open circle) and SLAC (closed circle) was monitored after 120-min incubation at 70°C, pH 4.0

#### Inhibitors effect on laccase activity

The effect of some putative laccase inhibitors was studied and results are summarised in Table 1. Interestingly, SLAC showed a higher resistance to metal ion chelation by EDTA compared to TvLac. TvLac was also completely inhibited by 1.0 mM sodium azide while SLAC was not affected. These results indicate that SLAC was highly resistant to these typical laccase inhibitors.

#### Dye decolourisation by laccase

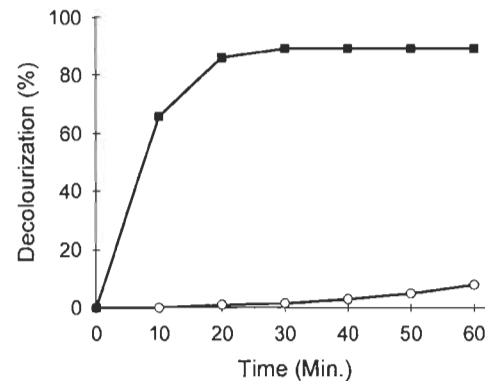
The purified laccase could efficiently decolourise the indigo dye with syringaldehyde as redox mediator. As shown in Fig. 5, more than 85% decolourisation for the dye (25  $\mu$ M) was obtained within 20-min incubation at 45°C with 100 mU ml<sup>-1</sup> of laccase in 50-mM MES–glycine buffer (pH 9.0). The enzyme alone could also decolourise the dye but with a much lesser extend (8% within 60 min) in the same conditions.

### Discussion

Laccase genes are usually expressed at very low levels in the native hosts, but recently two studies have demonstrated great potential for higher expression (Lomascolo et al.

**Table 1** Inhibitors effect on laccase activity

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)	
		TvLAC	SLAC
None	–	100	100
EDTA	1	100	100
	10	82	100
NaN <sub>3</sub>	1	0	100
	10	0	78



**Fig. 5** Decolourisation of Indigo carmine by SLAC. SLAC alone (open circle) and SLAC with syringaldehyde as mediator (closed square) after 60 min at 45°C, pH 9.0. No decolourisation was achieved when syringaldehyde was used without SLAC (data not shown)

2003; Alves et al. 2004). The maximum reported laccase production level has been obtained using *Pycnoporus cinnabarinus* ss3, with ethanol as an inducer. It yielded an average of 1,000–1,500 mg L<sup>-1</sup> (Lomascolo et al. 2003). In another study with *P. cinnabarinus*, a similar yield was claimed (1,000–1,200 mg L<sup>-1</sup>, Alves et al. 2004). In that case, the homologous laccase gene was placed under the regulation of the promoter of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Schizophyllum commune*. In comparison to such commercially viable production yields, the production of bacterial laccases has been limited by an extremely low production yield. For example, the productivity of the laccase of *S. lavendulae* was very low with a yield of 0.045 mg g<sup>-1</sup> mycelia (Suzuki et al. 2003). When produced in *Escherichia coli*, its laccase expression yielded 30 mg L<sup>-1</sup> but the recombinant enzyme formed aggregates and was difficult to purify (Suzuki et al. 2003). Production of *B. subtilis* laccase in *E. coli* also resulted in extensive intracellular aggregation, resulting in only 10% extraction yield for the heterologous laccase (Martins et al. 2002). To our knowledge, the production system provided here is the first high expression system reported so far for a bacterial laccase. In shake flask liquid cultures, it produced a considerably large amount of laccase, 350 mg L<sup>-1</sup> with a high purity yield (90–95%). Because the enzyme is secreted in the media, no extensive purification system was required. We expect to get a higher production yield with fermentation cultures. Because it is a bacterial expression system, it has the benefit of being relatively simple to use compared to a fungal expression system which is much more difficult to work with.

The activity of SLAC is remarkable in that it achieved oxidation of substrates over a wide pH range. SLAC demonstrated optimum oxidation of a phenolic substrate like ABTS at pH 4.0 while another phenolic substrate like DMP at an optimum at pH 9.0. Our comparison with *T.*

*versicolor* confirmed an optimum at pH 4.0 for ABTS and DMP in the same conditions. Other studies on fungal laccase also point out that the optimum pH for oxidation of DMP is at an acidic pH (Slomczynski et al. 1995; Perie et al. 1998; Galhaup et al. 2002; Madzak et al. 2006). Because SLAC is also stable in a broad pH range (3.0 to 9.0), it is an excellent enzyme for various potential industrial applications, especially with phenolic compounds found in the textile industry.

Interestingly, SLAC also showed a high thermal stability. It has a half-life of 10 min at 90°C and 120 min at 70°C which is much better than TvLac. Other thermostable laccases have been published (Chefetz et al. 1998; Martins et al. 2002; Suzuki et al. 2003) and SLAC thermostability is to some extent comparable to the one of *S. lavendulae* REN-7 laccase (STSL; Suzuki et al. 2003). This ability to resist to higher temperature is a great asset for future industrial applications with this enzyme.

Another remarkable property of SLAC versus other laccases is its higher resistance toward conventional inhibitors. While laccases like TvLac or STSL are completely inhibited by 1 mM NaN<sub>3</sub> (Suzuki et al. 2003), SLAC remained at a 100% activity. Moreover, even at 10 mM, the enzyme is still active. Interestingly, EpoA, which shows a high a.a. sequence homology with SLAC (71%), also have a higher resistance toward common laccase inhibitors (Endo et al. 2003). There must be something in their 3D structure, possibly linked to the trinuclear copper cluster site, which gave them that ability. Investigation of these enzymes' crystalline structures might reveal the origin of this resistance.

The primary use of Indigo carmine in the textile industry is as a dye for cotton work clothes and blue jeans. Commercial formulations of laccase are used to bleach denim. Those formulations are known to contain redox mediator to help in the bleaching process but their exact nature is undisclosed. A previous study suggests that syringaldehyde and acetosyringone were two of the best natural redox mediators to use for dye decolourisation (Camarero et al. 2005). In our study, we have shown the decolourisation of Indigo carmine with SLAC. Our results showed that SLAC alone was able to decolourise Indigo carmine partially after a 60-min treatment at 45°C. But decolourisation was more efficient in the presence of syringaldehyde. More than 85% decolourisation was observed after only 20 min. These results suggest a potential use of laccase for dye decolourisation at the industrial level. Further studies are needed to evaluate the potential of SLAC, in combination with different mediators, to decolourise various types of dye employed in the textile industry.

The need of a robust and inexpensive laccase is essential to overcome the major barriers that restrict the use of this class of enzyme in the industrial sector. By way of a

bacterial expression system, we have shown that we could produce a large amount of laccase with a high purity yield. No extensive purification system was required. The enzyme produced possesses a broad pH working range and shows a high thermostability. This enzyme also showed a good potential for rapid decolourisation of Indigo carmine with a redox mediator. Further studies will look into a more in-depth evaluation of dye decolourisation potential and optimisation of the expression system. In addition, because the bacterial production system used in this study is readily amenable to the development of accelerated evolution strategies, we will also investigate strategies for further optimisation of the enzyme for various industrial applications.

**Acknowledgements** This work was supported by the Canada research chair on value-added papers from the Centre Intégré en Pâtes et Papiers (Trois-Rivières, Canada), AgroTerra Biotech (Trois-Rivières, Canada), the Institut National de la Recherche Scientifique—Institut Armand-Frappier (Laval, Canada) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## References

- Alexandre G, Zhulin IB (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotech* 18:41–42
- Alves A, Record E, Lomascolo A, Scholtmeijer K, Asther M, Wessels JGH, Wosten HAB (2004) Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 70:6379–6384
- Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41:7325–7333
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Burton SG (2003) Laccases and phenol oxidases in organic synthesis—a review. *Curr Org Chem* 7:1317–1331
- Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez AT (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol* 71:1775–1784
- Chefetz B, Chen Y, Hadar Y (1998) Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl Environ Microbiol* 64:3175–3179
- Childs RE, Bardsley WG (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* 145:93–103
- Claus H (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35:93–96
- Endo K, Hayashi Y, Hibi T, Hosono K, Beppu T, Ueda K (2003) Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J Biochem (Tokyo)* 133:671–677
- Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J Biol Chem* 278:19416–19425
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J, Haltrich D (2002) Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes*



- pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology 148:2159–2169
- Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. Nat Struct Biol 9:601–605
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I (2001) CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. J Bacteriol 183:5426–5430
- Hurtubise Y, Shareck F, Kluepfel D, Morosoli R (1995) A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol Microbiol 17:367–377
- Jaouani A, Guillen F, Penninckx MJ, Martinez AT, Martinez MJ (2005) Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. Enzyme Microb Technol 36:478–486
- Kenealy WR, Jeffries TW (2003) Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments. In: Goodell B, Nicholas DD, Schultz TP (eds) Wood deterioration and preservation: advances in our changing world, ACS Symposium Series 845, Washington, pp 210–239
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation, Norwich
- Kluepfel D, Vats-Mehta S, Aumont F, Shareck F, Morosoli R (1990) Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. Biochem J 267:45–50
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. J Basic Microbiol 41:185–227
- Lomascolo A, Record E, Herpoel-Gimbert I, Delattre M, Robert JL, Georis J, Dauvin T, Sigoillot JC, Asther M (2003) Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. J Appl Microbiol 94:618–624
- Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn B, Canters GW (2004) Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. Protein Sci 13:2388–2397
- Madzak C, Mimmi MC, Catrinade E, Brault A, Baumberger S, Briozzo P, Mougin C, Jolival C (2006) Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. Protein Eng Des Sel 19:77–84
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. J Biol Chem 277:18849–18859
- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60:551–565
- Minussi RC, Pastore GM, Duran N (2007) Laccase induction in fungi and laccase/N–OH mediator systems applied in paper mill effluent. Bioresour Technol 98:158–164
- Moldes D, Sanroman MA (2006) Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. World J Microbiol Biotechnol 22:1197–1204
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ (1997) Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Curr Microbiol 34:1–5
- Perie FH, Reddy GVB, Blackburn NJ, Gold MH (1998) Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. Arch Biochem Biophys 353:349–355
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. J Biol Chem 277:37663–37669
- Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol Adv 24:500–513
- Sharma P, Goel R, Capalash N (2007) Bacterial laccases. World J Microbiol Biotechnol 23:823–832
- Slomczynski D, Nakas JP, Tanenbaum SW (1995) Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. Appl Environ Microbiol 61:907–912
- Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y (2003) A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. Biosci Biotechnol Biochem 67:2167–2175
- Ward AC (1992) Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR. BioTechniques 13:350
- Yoshida H (1883) Chemistry of lacquer (urushi). J Chem Soc Trans 43:472–486

## CHAPITRE III

### ARTICLE SCIENTIFIQUE 2

#### 3.1 Résumé

Une des conséquences de la fabrication d'encre et de colorants, ainsi que de l'utilisation de ces derniers dans l'industrie du textile, est le rejet d'eaux usées colorées. Deux pour cent de toutes les encres fabriquées est perdu directement dans les cours d'eau et plus de 10% est également perdu pendant le procédé de coloration du textile. Ce n'est donc pas surprenant que ces composés soient devenus une préoccupation environnementale majeure. Dans ce contexte, nous avons évalué l'utilisation potentielle d'une laccase bactérienne pour la décoloration de diverses encres avec ou sans la présence d'un médiateur. Dans tous les cas étudiés, nos résultats ont démontré que la laccase, combinée à l'acétosyringone, est capable de rapidement décolorer tous les colorants testés à divers degrés. En seulement 10 min, 94% de l'indigo carmine, 91% du bleu de Chicago et 65% du Reactive black 5 ont été décolorés. De plus, sur une période de 60 min, il a été observé que 21% du Reactive blue 19 et 39% du rouge de Congo ont été décolorés. Ces résultats démontrent l'utilisation potentielle de cette laccase en combinaison avec l'acétosyringone, un médiateur naturel, pour la décoloration de diverses encres.

### 3.2 Présentation de l'article et contribution des auteurs

Decolourization of recalcitrant dyes with a laccase from *Streptomyces coelicolor* under alkaline conditions.

Etienne Dubé, François Shareck, Yves Hurtubise, Marc Beauregard et Claude Daneault\*

E. Dubé, Y. Hurtubise et M. Beauregard

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

F. Shareck

INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Ville de Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

C. Daneault (\* Corresponding author)

Chaire de recherche du Canada en fabrication de papiers à valeur ajoutée

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, e-mail: [claudedaneault@uqtr.ca](mailto:claudedaneault@uqtr.ca), Phone: +1(819)376-5011 ext.: 4505; Fax: +1(819)376-5148

Contribution des auteurs : M. Etienne Dubé est le principal auteur de cette étude et la majeure partie des travaux de recherche ont été effectués par lui. M. François Shareck est un collaborateur externe qui a participé au développement du système d'expression de la laccase. M. Yves Hurtubise est un collaborateur privé qui a participé au développement du système d'expression de la laccase. Il est le directeur R&D de la compagnie AgroTerra Biotech. M. Claude Daneault est le directeur de recherche et M. Marc Beauregard est le codirecteur de recherche.

## Decolourization of recalcitrant dyes with a laccase from *Streptomyces coelicolor* under alkaline conditions

Etienne Dubé · François Shareck · Yves Hurtubise ·  
Marc Beauregard · Claude Daneault

Received: 1 November 2007 / Accepted: 18 June 2008  
© Society for Industrial Microbiology 2008

**Abstract** Colored wastewater from textile industries is a consequence of dye manufacturing processes. Two percent of dyes that are produced are discharged directly in aqueous effluent and more than 10% are subsequently lost during the textile coloration process. It is not surprising that these compounds have become a major environmental concern. In that context, we have evaluated the potential use of *Streptomyces coelicolor* laccase for decolourization of various dyes with and without a mediator. Results showed that in all cases the combination of laccase and the mediator acetosyringone was able to rapidly decolourize, to various degrees, all the dyes tested. In 10 min, decolourization was achieved at 94% for acid blue 74, 91% for direct sky blue 6b and 65% for reactive black 5. Furthermore, decolourization was achieved at 21% for reactive blue 19 and at 39% for the direct dye Congo red in 60 min. These results demonstrate the potential use of this laccase in combination with acetosyringone, a natural mediator, for dye decolourization.

**Keywords** Laccase · Mediator · Textile · Dye · Decolourization · Wastewater

### Introduction

The first laccase studied was from *Rhus vernicifera* in 1883, a Japanese lacquer tree, from which the designation laccase was derived [1]. Laccases are defined in the Enzyme Commission nomenclature as oxidoreductases acting on diphenols and related substances using molecular oxygen as acceptor (EC 1.10.3.2). They are multicopper proteins found mostly in plants and fungi but also in some bacteria [2–4]. The protein structure acts as an intricate ligand for the catalytically active coppers, providing them with a coordination sphere where changes between the reduction states are thermodynamically possible. They contain at least one type-1 (T1) copper, which is associated to the oxidation site, and typically harbor at least three additional coppers: one type-2 (T2) and two type-3 (T3) coppers arranged in a trinuclear cluster. This cluster is associated with the site where reduction of molecular oxygen occurs [5–8].

Laccases are of particular interest with regard to various commercial applications because of their ability to oxidize a wide range of relevant substrates. Thus, research is being carried out in various fields of interest: textile, pulp and paper, food and cosmetics industries, as well as in bioremediation, biosensor, biofuel and organic synthesis applications [3, 9–13]. Few commercialized laccase products are already available: Denilite I and II from Novozymes (Denmark) and Zylite from Zytex (India). These products are used in the textile industry for denim bleaching. Usually, mediators are used with laccase in order to optimize the process. Once oxidized by the enzyme, these molecules act as electron scavenger and attack the dye, which eventually results in bleaching in the end [14, 15].

Dyes are used in numerous industries. While textile mills predominantly use them, dyes can also be found in the

E. Dubé · Y. Hurtubise · M. Beauregard · C. Daneault (✉)  
Département de chimie-biologie, Université du Québec à  
Trois-Rivières, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières,  
Québec G9A 5H7, Canada  
e-mail: claudedaneault@uqtr.ca

F. Shareck  
INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec,  
531 boul. des Prairies, Ville de Laval,  
Québec H7V 1B7, Canada

food, pharmaceutical, paper printing and cosmetics industries. These compounds retain their color as well as their structural integrity under exposure to sunlight and they exhibit a high resistance to microbial degradation [16, 17]. Because of these properties many of them find their way into the environment via wastewater treatment facilities. It is not surprising that these compounds have become a major environmental concern.

Recently, we have cloned a laccase gene from *Streptomyces coelicolor* and expressed the protein with the goal of investigating its potential uses for industrial applications [18]. Using an efficient bacterial expression system, large quantities of this laccase (SLAC) could be produced with a high purity yield and no extensive purification steps were required. The enzyme produced possesses a broad pH working range and has a high thermostability. This enzyme also showed a good potential for rapid decolourization of Indigo carmine, with syringaldehyde as redox mediator, at pH 9.0 [18]. Since most wastewaters from textile industries are characterized by a neutral to alkaline pH (around 7–11) [19, 20], the potential use of SLAC could be advantageous compared to typical fungal laccases which are generally acidic by nature and are not active in this pH range. The decolourization properties of this bacterial laccase have never been extensively studied before. Therefore, the main objective of this work was to determine if this enzyme was able to oxidize various dyes, with and without a mediator, to help in the reduction of their environmental impact.

## Materials and methods

### Substrates and chemicals

Unless specified otherwise, all substrates and chemicals were of analytical grade or better and purchased from Sigma-Aldrich.

### Organisms and vectors

*Streptomyces lividans* IAF10-164 (msiK<sup>−</sup>), a xylanase- and cellulase-negative mutant, served as host strain for the recombinant plasmid [21]. Plasmid pIAFD95A was used for gene expression.

### Cloning of the laccase gene

The coding sequence for the laccase of *S. coelicolor* A3(2) was available from Genbank (accession number CAB45586). The structural gene was amplified from total DNA of *S. coelicolor* A3(2) by PCR using the following primers: 5-GAAACGCGATGCACAGGCGAG-GCTTTAACCG-3 (F) and 5-CCTGGAGCTCAGTGCTCGTGTTT-GTGTGCG-3

(R). The forward primer (F) introduced a *SphI* site (underlined) at the start codon (italic) and the reverse primer (R) introduced a *SacI* (underlined) after the stop codon (italic). The amplification product was digested with *SphI*–*SacI* and cloned into plasmid pIAFD95A. Protoplasting, transformation of the mutant IAF10-164 and spore preparations were performed as described by Kieser et al. [22]. Screening of *Streptomyces* transformants was carried out using the colony-PCR technique [23]. DNA extracts were sequenced and analyzed with an ABI Prism 3100 to confirm the sequence of the cloned gene.

### Culture conditions

The strain was maintained on a 7-day-old fresh Bennett agar containing a modified yeast-extract malt-extract medium, in which 0.4% maltose was substituted for glucose. Spore suspensions prepared from such slants were used as inocula for vegetative cultures in 100 mL trypticase soy broth (TSB) with glass beads. Incubation was carried out at 34 °C on a rotary shaker at 240 rpm for a period of 24 h. Enzyme production was carried out in 1 L Erlenmeyer flasks containing 80 ml of M<sub>14</sub> medium, as previously described by Kluepfel et al. [24], using 1% (v/v) of D-xylose as main carbon source. The flask cultures were incubated at 34 °C on a rotary shaker at 240 rpm for 72 h.

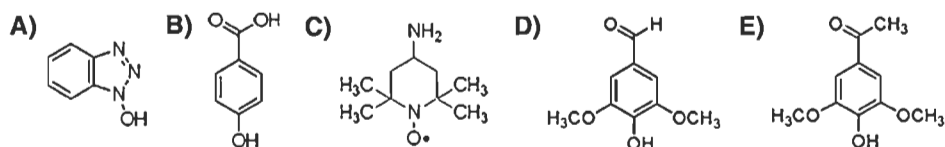
### Protein purification

The fermentation broth was recovered by centrifugation at 11,000×g for 30 min at 4 °C. Prior to protein purification, the laccase supernatant was incubated overnight with 25 µM of CuSO<sub>4</sub> to restore the enzymatic activity. The supernatant was then filtered on a 0.2 µm membrane to retain any floating particles and concentrated fivefold by ultrafiltration with an Amicon system (Millipore) using a 10 kDa cut-off membrane.

### Enzymatic activity and protein determination

Laccase activity was determined at 25 °C using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) or 2,6-dimethoxyphenol (DMP) as the substrate. The oxidation of the substrate was detected by measuring the absorbance at 420 nm for ABTS ( $\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [25] and at 470 nm for DMP ( $\epsilon = 27,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [26]. The reaction mixture (300 µl) contained 5 µl of appropriately diluted enzyme sample, 150 µl of MES-glycine buffer (0.1 M, pH 4.0), 20 µl of 60 mM ABTS or DMP and 125 µl of H<sub>2</sub>Odd. Activity was calculated in international unit (IU) which is the amount of laccase that oxidizes 1 µmol of substrate per min. The protein content was determined at 595 nm using the Pierce Coomassie Plus protein assay reagent [27] with

**Fig. 1** Mediators used in this study. **a** 1-hydroxybenzotriazole, **b** 4-hydroxybenzoic acid, **c** 4-acetamido-TEMPO, **d** syringaldehyde and **e** acetosyringone



bovine serum albumin as a standard. The absorbance was measured with a Multiskan Ascent spectrophotometer (Thermo electron, Inc., USA).

#### Screening of mediators

Screening of mediators was done via the decolourization of acid blue 74 by SLAC with the various mediators (Fig. 1). The mediators selected were 1-hydroxybenzotriazole (HBT), 4-hydroxybenzoic acid (HBA), 4-acetamido-TEMPO (TEMPO), syringaldehyde and acetosyringone (60 mM solution prepared with ethanol). Those compounds are typical laccase mediators used for dye decolourization [14, 15, 28]. The reaction mixture (300  $\mu$ l) contained 50 mM MES–glycine buffer (pH 9.0), dye (final concentration 25  $\mu$ M), concentrated enzyme (100 mU) and mediator solution (final concentration 1 mM). Reactions were initiated by enzyme addition and incubated at 45 °C for 60 min. Control samples were run in parallel with a deactivated enzyme (boiled for 20 min) under identical conditions. Dye decolourization was determined by measuring the absorbance at 595 nm. The results are expressed in percentage of decolourization.

#### Effect of pH on decolourization

The effect of pH on decolourization was evaluated via the same method used for the mediators screening except that the tests were run for 10 min. The pH range tested was from 3.0 to 11.0 in 50 mM MES–glycine buffer. Only syringaldehyde and acetosyringone were evaluated.

#### Mediators concentration

For mediator concentration evaluation, we used the same method as in the mediators screening except that the tests were run for 10 min. The concentration range tested was from 0 to 2 mM. Only syringaldehyde and acetosyringone were evaluated.

#### Dyes decolourization by laccase

For this study five dyes with different chemical structures were selected (Fig. 2). The decolourization of reactive blue 19 (RB19), direct sky blue 6b (DSB6b), acid blue 74 (AB74), reactive black 5 (RB5) and congo red (CR) by laccase were tested with and without a mediator. The

mediators selected were syringaldehyde and acetosyringone. The reaction mixture (300  $\mu$ l) contained 50 mM MES–glycine buffer (pH 9.0), dye (final concentration 10, 15 or 25  $\mu$ M depending on the dye), purified enzyme (100 mU) and mediator solution (final concentration 1 mM). Reactions were initiated by enzyme addition and incubated at 45 °C for 60 min. Control samples were run in parallel with a deactivated enzyme (boiled for 20 min) under identical conditions. Dye decolourization was determined by measuring the absorbance at 595 nm for RB19, DSB6b, AB74, RB5 and 492 nm for CR. The results are expressed in percentage of decolourization.

#### Data analysis

Enzymatic activity, protein determination, mediator screening and decolourization assays were performed in triplicate. All standard deviations were below 10% of the mean values presented.

## Results

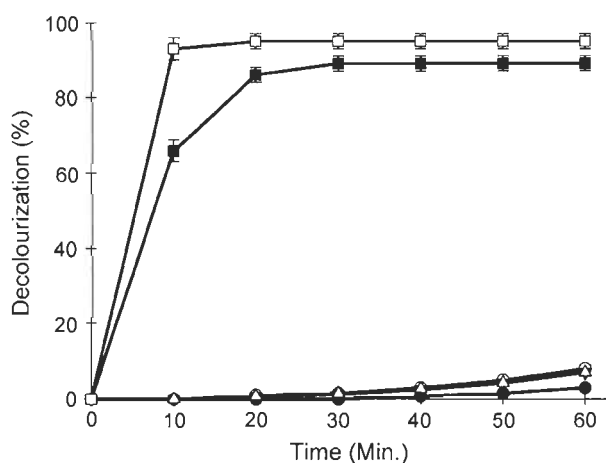
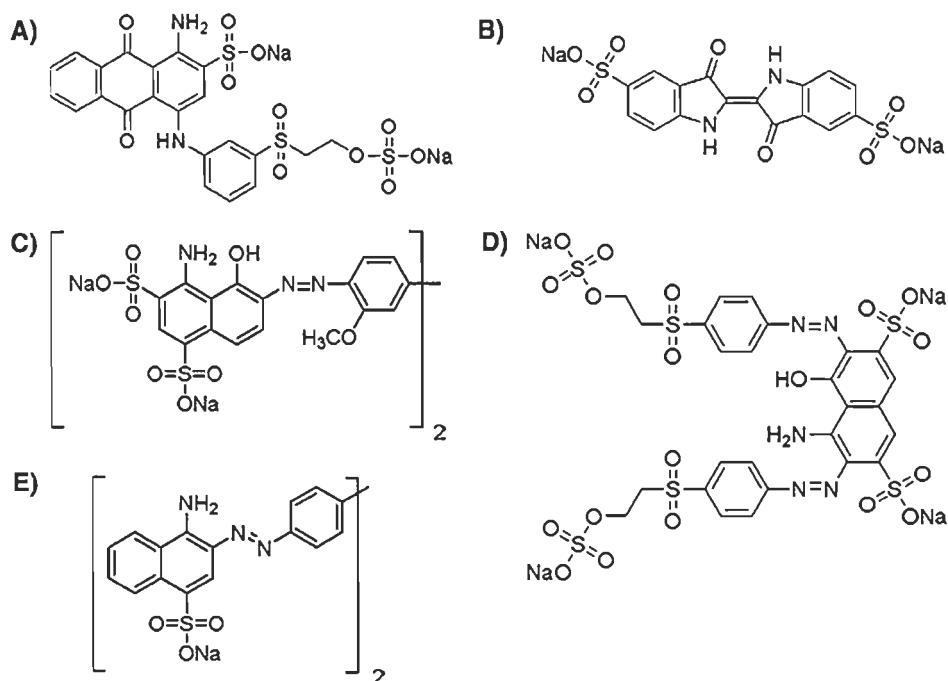
#### Mediator screening and dye decolourization conditions

Among the five phenolic compounds screened as laccase mediators, two allowed a high decolourization of AB74 (indigo carmine) with the use of SLAC (Fig. 3). While HBT, HBA and TEMPO did not give a better decolourization than laccase alone, syringaldehyde and acetosyringone produced decolourization of 89 to 95%, respectively, in 20 min. Since they yielded the highest decolourization as rate means per min, they were selected for additional studies with different types of dyes.

The optimum pH for phenolic compound oxidation by a laccase may vary depending on the substrate used. For instance, the optimal pH for ABTS and DMP oxidation by SLAC was pH 4.0 and 9.0, respectively (Fig. 4). With syringaldehyde or acetosyringone the best decolourization results in 10 min, for AB74, were obtained between pH 7.0–9.0 (Fig. 5). Thus, subsequent decolourization assays were performed at pH 9.0.

For economical purposes, the concentration of various mediators was determined for the assays. The lowest mediator concentration used, for syringaldehyde or acetosyringone, to reach the highest decolourization of AB74 in 10 min, was achieved at 1.0 mM (Fig. 6). Thus, subsequent

**Fig. 2** Dyes used in this study. **a** Reactive blue 19, **b** acid blue 74, **c** direct sky blue 6b, **d** reactive black 5 and **e** Congo red

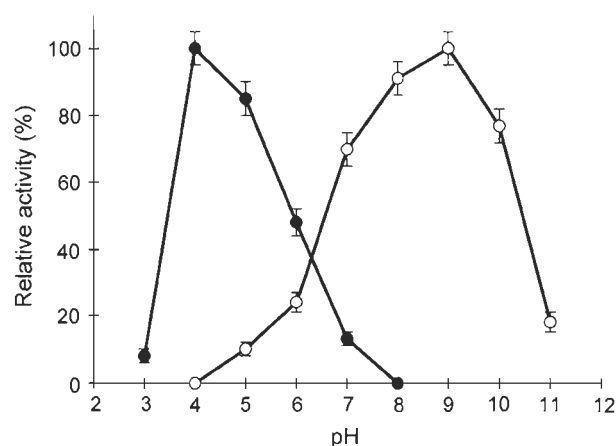


**Fig. 3** Mediators screening via the decolourization of AB74 with SLAC. SLAC alone (*open circle*), SLAC with TEMPO (*closed circle*), SLAC with HBT (*closed triangle*), SLAC with HBA (*open triangle*), SLAC with syringaldehyde (*closed square*) and SLAC with acetosyringone (*open square*) after 60 min at 45 °C, pH 9.0. No decolourization was achieved when mediators were used without SLAC (data not shown). All standard deviations were below 10% of the mean values presented

decolourization assays were performed with a mediator concentration of 1.0 mM.

#### Decolourization of different types of dyes

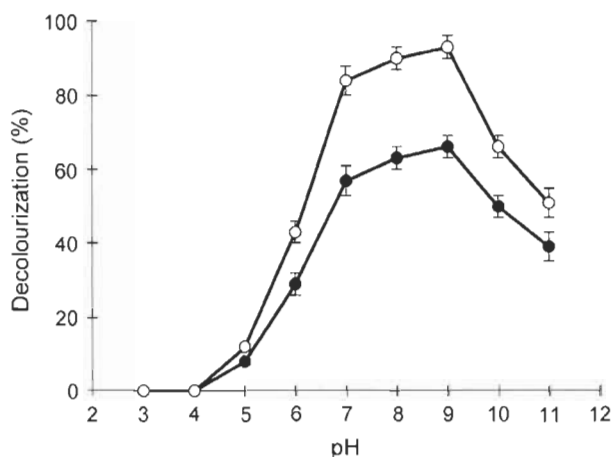
The enzyme SLAC alone or in combination with a mediator was used to evaluate the oxidation of the various dyes. Syringaldehyde or acetosyringone were used as laccase mediator. Table 1 show that SLAC alone was able to decolourize



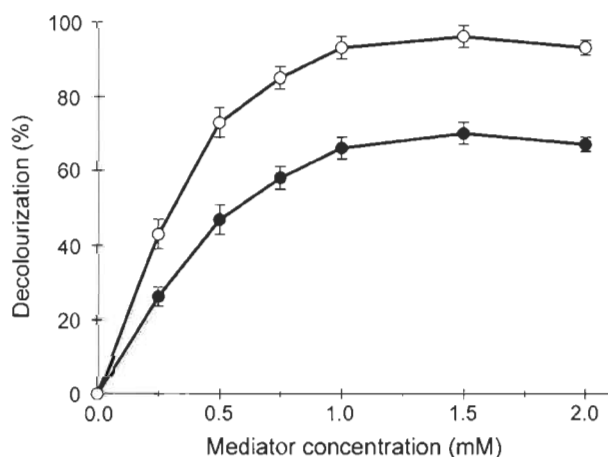
**Fig. 4** Effect of pH on the activity of SLAC. Activity was measured in the presence of 6 mM ABTS (*closed circle*) or DMP (*open circle*). Relative activity was normalized to the maximal activity achieved when using either substrate at the optimal pH. All standard deviations were below 10% of the mean values presented

all the dyes tested but the process is not efficient and needs a longer time treatment. Almost no decolourization was observed after 1 h. After 5 h, a decolourization of 11–40% was achieved for the different dyes tested. The addition of syringaldehyde or acetosyringone provided better results than the laccase treatment alone. The combination SLAC-syringaldehyde efficiently decolourized the diazo dye DSB6b and the indigoid dye AB74 by 81% or more after 1 h. However, this combination was inefficient for the decolourization of the anthraquinoid dye RB19 and the azo dye CR. No decolourization was achieved. Our results also





**Fig. 5** Effect of pH on mediator oxidation of AB74. SLAC with syringaldehyde (closed circle) and SLAC with acetosyringone (open circle) in MES–glycine buffer pH 3.0–11.0 after 10 min at 45 °C. All standard deviations were below 10% of the mean values presented



**Fig. 6** Effect of mediator concentration on the oxidation of AB74. SLAC with syringaldehyde (closed circle) and SLAC with acetosyringone (open circle) in MES–glycine buffer pH 9.0 after 10 min at 45 °C. All standard deviations were below 10% of the mean values presented

demonstrated that the combination SLAC-acetosyringone gave better results than the combination SLAC-syringaldehyde. In 1 h, this combination could decolourize all the dyes evaluated in this study. RB19 and CR were the most resistant to oxidation by the treatment. They were decolourized by 21 and 39%, respectively, in 1 h. This treatment has a better efficiency toward DSB6b, AB74 and the diazo dye RB5. DSB6b and AB74 were decolourized by 91% or more and RB5 by 65% in only 10 min.

## Discussion

Colored wastewater is a consequence of batch processes both in the dye manufacturing industries and in the

**Table 1** Decolourization of five dyes by SLAC without or with mediators, for different time treatment, at pH 9.0, 45 °C

	Decolourization of dye (%)				
	RB19	DSB6b	AB74	RB5	CR
SLAC					
10 min	0	0	0	0	0
60 min	0	4	8	0	0
5 h	23	20	40	11	13
SLAC + SYR					
10 min	0	64	66	2	0
60 min	0	81	89	17	0
SLAC + ACE					
10 min	1	91	94	65	3
60 min	21	92	95	89	39

SYR Syringaldehyde, ACE acetosyringone, concentration of 1 mM

All standard deviations were below 10% of the mean values presented

dye-consuming industries. Two percent of dyes that are produced are discharged directly in aqueous effluent, and 10% are subsequently lost during the textile coloration process [29]. Since there are thousands of commercially available dyes with over  $7 \times 10^5$  tons of dye-stuff produced annually [30], it is not surprising that these compounds have become a major environmental concern. The ability of laccase enzymes to degrade different varieties of dyes such as azo, anthraquinoid, triarylmethane and indigoid implies that it offers potential application in textile dye bleaching processes [14, 28]. A study from Claus et al. has demonstrated that a laccase from *Trametes versicolor* was able to decolourize 3% of RB5, 82% of AB74 and 63% of RB19 in 16 h [28]. In comparison, under the conditions used our results showed that SLAC alone was able to decolourize 11% of RB5, 40% of AB74 and 23% of RB19 in only 5 h at pH 9.0.

Until recently, the development of a successful enzymatic solution for the textile industry has been hindered by poor kinetics between the enzyme and various dyes. The use of small molecules that are able to act as electron transfer mediators between the enzyme and the dye has opened up new possibilities in this field of research [14, 28]. A previous study suggested that syringaldehyde and acetosyringone were two of the best redox mediators to use for dye decolourization [14]. In this study, we tested the decolourization of Indigo carmine with SLAC and different synthetic and natural mediators (HBT, HBA, TEMPO, syringaldehyde and acetosyringone). Our results did not show higher decolourization rate with HBT, HBA and TEMPO than laccase alone. These poor results could be attributed to bad kinetics between the enzyme and these mediators since SLAC is described as a low redox potential laccase [31]. Nevertheless, our results also demonstrated that syringaldehyde



and acetosyringone were the best redox mediators to use for dye decolourization. Since these compounds are involved in the degradation of lignin by white-rot fungi in the environment; they are therefore naturally occurring laccase mediators [32]. The use of natural mediators will present environmental and economic advantages for future industrial applications.

The main reason for dye loss is the incomplete exhaustion of dyes on to the fiber. This loss varies from one dye to the other and depends on the classification of the dye [33]. Up to 20% of the initial dye mass used in the dyeing process is lost in the effluent for acid dyes, up to 30% for direct dyes and up to 50% for reactive dyes. Reactive dyes make up approximately 30% of the total dye market [29]. This impact is considerable for the environment and needs to be addressed.

While laccase alone has a limited potential for dye decolourization, the LMS (laccase-mediator system) can improve significantly the decolourization properties of laccase toward various dye class [14, 15, 28]. In a previous study, the addition of HBT as mediator increased the laccase decolourization level of RB5 from 3 to 70% [28]. Under the conditions used, our results showed that in all cases decolourization with the combination SLAC-acetosyringone was better than with laccase alone. This combination rapidly decolourized all the dyes tested to various degrees. In 10 min, decolourization was achieved at 94% for AB74, 91% for DSB6b and 65% for RB5. In comparison, using fungal laccases from *Pycnoporus cinnabarinus* and *Trametes villosa*, with acetosyringone as mediator, other researchers achieved a decolourisation level of 100% for AB74 and of 84% for RB5 in less than 10 min at pH 5.0 [14]. As stated before, most wastewaters from textile industries are characterized by a neutral to alkaline pH (around 7–11) [19, 20]. For this application, SLAC offers an important advantage compared to typical acidic fungal laccases which are not active in this pH range.

## Conclusion

This study confirms that the particular laccase investigated here, SLAC, can use natural mediators and decolourize dyes under alkaline conditions. Because of practical applications in the textile industry for denim bleaching and wastewaters treatment at a neutral to alkaline pH, the potential use of this alkaline laccase opens up new possibilities for the development of green technology alternatives to existing chemical treatment. Future work is under way that will examine decolourization potential of this laccase toward others dyes and also investigates whether or not the resulting products from the dye oxidation are toxic in any way.

**Acknowledgments** This work was supported by the Canada research chair on value-added papers from the Centre Intégré en Pâtes et Papiers (Trois-Rivières, Canada), AgroTerra Biotech (Trois-Rivières, Canada), the Institut National de la Recherche Scientifique–Institut Armand-Frappier (Laval, Canada) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## References

- Yoshida H (1883) Chemistry of lacquer (urushi). *J Chem Soc Trans* 43:472–486
- Alexandre G, Zhulin IB (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol* 18:41–42
- Claus H (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35:93–96
- Sharma P, Goel R, Capalash N (2007) Bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol* 23:823–832
- Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41:7325–7333
- Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J Biol Chem* 278:19416–19425
- Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat Struct Biol* 9:601–605
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277:37663–37669
- Burton SG (2003) Laccases and phenol oxidases in organic synthesis—a review. *Curr Org Chem* 7:1317–1331
- Kenealy WR, Jeffries TW (2003) Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments. In: Goodell B, Nicholas DD, Schultz TP (eds) *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*. ACS symposium series, vol 845. American Chemical Society, Washington, pp 210–239
- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551–565
- Minussi RC, Pastore GM, Duran N (2007) Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresour Technol* 98:158–164
- Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24:500–513
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol* 71:1775–1784
- Moldes D, Sanroman MA (2006) Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World J Microbiol Biotechnol* 22:1197–1204
- Hao OJ, Kim H, Chiang PC (1999) Decolorization of wastewater. *Crit Rev Environ Sci Technol* 30:449–505
- Kandelbauer A, Guebitz G (2005) Bioremediation for the decolorization of textile dyes—a review. In: *Environmental Chemistry*. Springer, Berlin, pp 269–288
- Dubé E, Shareck F, Hurtubise Y, Daneault C, Beaugard M (2008) Homologous cloning, expression and characterization of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourization of an indigo dye. *Appl Microbiol Biotechnol* (in press)

19. Manu B, Chaudhari S (2002) Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Bioresour Technol* 82:225–231
20. Jahmeerbacus MI, Kistamah N, Ramgulum RB (2004) Fuzzy control of dyebath pH in exhaust dyeing. *Coloration Technol* 120:51–55
21. Hurtubise Y, Shareck F, Kluepfel D, Morosoli R (1995) A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol Microbiol* 17:367–377
22. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich
23. Ward AC (1992) Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR. *BioTechniques* 13:350
24. Kluepfel D, Vats-Mehta S, Aumont F, Shareck F, Morosoli R (1990) Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem J* 267:45–50
25. Childs RE, Bardsley WG (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2, 2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* 145:93–103
26. Jaouani A, Guillen F, Penninckx MJ, Martinez AT, Martinez MJ (2005) Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme Microb Technol* 36:478–486
27. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72:248–254
28. Claus H, Faber G, König H (2002) Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:672–678
29. Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT (2003) The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigments* 58:179–196
30. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol* 77:247–255
31. Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn B, Canters GW (2004) Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci* 13:2388–2397
32. Camarero S, Ibarra D, Martinez AT, Romero J, Gutierrez A, del Rio JC (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb Technol* 40:1264–1271
33. Blackburn RS (2004) Natural polysaccharides and their interactions with dye molecules: applications in effluent treatment. *Environ Sci Technol* 38:4905–4909

## CHAPITRE IV

### ARTICLE SCIENTIFIQUE 3

#### 4.1 Résumé

La déposition de la poix du bois (wood pitch) est un problème complexe qui a augmenté avec l'introduction de nouvelles pratiques dans l'industrie papetière, telle que la fermeture des circuits d'eau fraîche et le recyclage du papier. Dans le procédé de fabrication du papier, les particules colloïdales de la poix du bois ont tendance à s'agglomérer et à se déposer par la suite sur les fibres de la pâte à papier et sur les équipements. Ces dépôts réduisent ainsi l'efficacité des systèmes de lavages, augmente la quantité de saletés, d'agents de blanchiment et ils réduisent aussi le niveau de blancheur du papier ce qui entraînent des imperfections dans la production de ce dernier. La poix du bois est insoluble dans l'eau et est composée d'acides gras, d'acides résiniques, de stérols, de stéryl-esters, de triglycérides et de petits fragments de lignine. Nous avons travaillé sur le développement d'une solution efficace pour réduire la quantité de matières extractibles dans la pâte thermomécanique et les eaux de procédés via une approche biotechnologique. L'efficacité de cette méthode a été quantifiée par des analyses GC-MS et GC-FID. Les résultats démontrent qu'avec la combinaison d'un nouveau surfactant écologique et d'une lipase, nous avons obtenus une réduction de 48% du groupe des acides résiniques, de 32% du groupe des stérols et de 78% du groupe des triglycérides. En combinant ce traitement enzymatique de la pâte avec la décontamination des eaux de procédés via une laccase, cette méthode entière devient une alternative efficace pour contrôler le problème global de la poix dans l'industrie papetière.

## 4.2 Présentation de l'article et contribution des auteurs

Enzyme-based approaches for pitch control in thermomechanical pulping of softwood and pitch removal in process water.

Etienne Dubé, François Shareck, Yves Hurtubise, Marc Beauregard et Claude Daneault\*

E. Dubé, Y. Hurtubise et M. Beauregard

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

F. Shareck

INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Ville de Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

C. Daneault (\* Corresponding author)

Chaire de recherche du Canada en fabrication de papiers à valeur ajoutée

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, e-mail:

[claudedaneault@uqtr.ca](mailto:claudedaneault@uqtr.ca), Phone: +1(819)376-5011 ext.: 4505; Fax: +1(819)376-5148

Contribution des auteurs : M. Etienne Dubé est le principal auteur de cette étude et la majeure partie des travaux de recherche ont été effectués par lui. M. François Shareck est un collaborateur externe qui a participé au développement du système d'expression de la lipase. M. Yves Hurtubise est un collaborateur privé qui a participé au développement du système d'expression de la lipase. Il est le directeur R&D de la compagnie AgroTerra Biotech. M. Claude Daneault est le directeur de recherche et M. Marc Beauregard est le codirecteur de recherche.

# Enzyme-based approaches for pitch control in thermomechanical pulping of softwood and pitch removal in process water

Etienne Dubé,<sup>1</sup> François Shareck,<sup>2</sup> Yves Hurtubise,<sup>1</sup> Marc Beauregard<sup>1</sup> and Claude Daneault<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

<sup>2</sup>INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Ville de Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

## Abstract

**BACKGROUND:** In the pulp and paper manufacturing process, pitch colloidal particles have a tendency to agglomerate and deposit on pulp fibres and equipments. They reduce the efficiency of the washer, increase the dirt count and bleach chemical consumption, reduce pulp brightness thus leading to paper defects. Triglycerides are considered to be the most problematic compounds during the manufacturing of mechanical and acidic sulfite pulps from various softwood species.

**RESULTS:** Using enzyme-based approaches, a pitch control method was developed for use with thermomechanical pulping of softwood and for pitch removal from process water. Results showed that with combination of a novel biodegradable surfactant and a lipase resin acids, sterols and triglyceride groups were reduced by 48%, 32% and 78%, respectively, compared with untreated samples. Using laccase treatment of the process water the fatty and resin acids were reduced by 42% and the lignans by 60%.

**CONCLUSION:** By combining the proposed pulp treatment with laccase decontamination of the process water, this new method offers an efficient alternative to control the various pitch-associated problems.

© 2008 Society of Chemical Industry

**Keywords:** pulp; paper; pitch; lipase; laccase; wastewater; triglycerides; resin acids; enzyme

## INTRODUCTION

Wood pitch deposition is a complex problem that has increased in importance owing to the introduction of new practices in pulp and paper mills, such as water systems closure and paper recycling.<sup>1,2</sup> The term pitch is applied to wood extractives and deposits of these colloidal particles during pulping and papermaking processes.<sup>2,3</sup> According to the Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI), wood extractives include a large number of compounds that are soluble in organic solvents. The main constituents of these extractives are resin acids, free fatty acids, triglycerides, sterols and sterol esters.<sup>1,4–6</sup> In addition to apolar wood extractives, degradation products such as tannins and small lignin fragments have also been described as common components of pitch deposits.<sup>5</sup> During papermaking processes, excessive pitch deposition can reduce the efficiency of the washer, increase the dirt count and bleach chemical consumption, reduce pulp brightness and lead to paper defects.<sup>7</sup> Toxicity toward fish and other organisms, caused by high concentrations of resin

acids, is also induced by the discharge of pulp and paper mill effluents. This is another issue regarding the environmental impact of wood pitch,<sup>4</sup> leading to economic loss for the industry (in the amount of 1% of sales<sup>7</sup>) and increased concerns for the environment.

Various methods are presently used by pulp and paper industries to decrease the total amounts of extractives during pulping. They consist mainly in the application of additives (such as alum, talc, dispersants, and lipase enzymes) to the pulp, the seasoning of logs or chips, and the use of pitch-degrading fungi that may be applied as a biological treatment to wood before pulping.<sup>4–12</sup>

Recently, a novel microbial lipase gene has been cloned, and the enzyme expressed with the goal of investigating its potential uses for industrial applications. Using an efficient bacterial expression system, large quantities of lipase (M-Lip) were produced with a high purity without extensive purification steps. Since the range of wood extractives degradable by lipase enzymes is limited, an original approach has been developed which could degrade

\* Correspondence to: Claude Daneault, Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, 3351 Des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

E-mail: claudedaneault@uqtr.ca

(Received 13 December 2007; revised version received 11 February 2008; accepted 11 February 2008)

Published online 4 April 2008; DOI: 10.1002/jctb.1939

a broader range of extractives through combination of the enzyme treatment with a novel ecological surfactant.

Although pitch reduction with lipase enzymes is potentially an efficient biotechnological technique, these enzymes act mostly on glycerides but do not degrade other extractives that form pitch deposits.<sup>7,9,13</sup> Thus, enzymes or other ingredients acting on a broader range of substrates need to be investigated. In this respect, laccase enzymes afford genuine advantages. These enzymes are of particular interest with regard to various commercial applications because of their ability to oxidize a wide range of relevant substrates.<sup>14–19</sup> Accordingly, research on laccase enzymes is currently being carried out to evaluate its potential for pitch control.<sup>9,20–24</sup> Following these studies, the combination of a surfactant with this group of enzymes has been assessed. Therefore, the objective of this work was to compare and evaluate both lipase and laccase-based treatments for wood pitch control, with the goal of developing an efficient system for the pulp and paper industries.

## MATERIALS AND METHODS

### Substrates and chemicals

Unless specified otherwise, all substrates and chemicals were of analytical grade or better and purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, On, Ca). The lipase (M-Lip) used in this study was from *Streptomyces lividans*. A laccase from *Trametes versicolor* (TvLac) was selected for the analysis (Sigma-Aldrich, Cat# 53 739). The surfactant (Surf), an alkanolamide, was obtained through collaboration with AgroTerra Biotech (ATB Trois-Rivières, Qc, Ca).

### Organisms and vectors

*S. lividans* IAF10-164 (msiK<sup>–</sup>), a xylanase- and cellulase-negative mutant, served as host strain for the recombinant plasmid.<sup>25</sup> Plasmid pIAF933-M-Lip was used for gene expression (gift from F. Shareck).

### Culture conditions

The strain was grown in rich TSB medium (27.5 g L<sup>–1</sup>) for 48 h at 34 °C, 240 rpm, followed by a sub-culture in M<sub>14</sub> minimal medium (per liter: 5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mL Tween 80 and 1 mL Mandels salts) supplemented after sterilization with MgSO<sub>4</sub> (0.03%), CaCl<sub>2</sub> (0.03%) and xylose (1%). Thiostrepton was added to a final concentration of 5 µg mL<sup>–1</sup> in liquid broth. Samples were collected after 72 h of incubation and kept at 4 °C.

### Protein purification

M-Lip was provided by IAF-ATB and was filtered through a 0.2 µm membrane to retain any floating particles and concentrated 5-fold by ultrafiltration with an Amicon system (Millipore, Massachusetts, USA) using a 10 kDa cut-off membrane.

### Enzymatic activity determination

Lipase activity was measured spectrophotometrically with chromogenic synthetic substrate of p-nitrophenyl esters. Hydrolysis of the substrate yields p-nitrophenol (pNP), which was monitored at 405 nm with a Cary (Varian, Inc., Palo Alto, Ca, USA) 300 Win/UV spectrophotometer. Substrates were dissolved in isopropanol and used at a final concentration of 0.9 mmol L<sup>–1</sup>. Purified enzymes were kept on ice and added just before starting the reaction.<sup>26</sup> One international unit (IU) of lipase was defined as the amount of enzyme needed to liberate 1 µmol of pNP min<sup>–1</sup> using p-NP-palmitate as substrate. Laccase activity was determined at 25 °C using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) as the substrate. Substrate oxidation was detected by measuring the absorbance at 420 nm for ABTS ( $\epsilon = 36\,000\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ )<sup>27</sup> with a Multiskan Ascent spectrophotometer (Thermo electron, Inc., USA). The reaction mixture (300 µL) contained 5 µL of appropriately diluted enzyme sample, 150 µL of MES-glycine buffer (0.1 mol L<sup>–1</sup>, pH 4.0), 20 µL of 60 mmol L<sup>–1</sup> ABTS or DMP and 125 µL of H<sub>2</sub>O dd. Activity was calculated in international unit (IU) which is the amount of laccase that oxidizes 1 µmol substrate min<sup>–1</sup>. All enzymes kinetics were measured in triplicate over a time period of 5 min.

### Pulp sample

Thermomechanical pulp (TMP) samples were obtained from a Canadian newsprint mill in Quebec. The pulp was collected after the latency chest. The wood furnished was a mixture of softwood species. The pulp samples were maintained at 4 °C prior to experiments.

### Biochemical treatments of the pulp samples

The biochemical treatments of the pulp samples were carried out at 60 °C for 2 h. Treatments were performed at pH 6.0 with lipase and pH 5.0 with laccase. The enzymatic dosage applied was 10 IU for the lipase and 5 IU for the laccase per g of air-dried pulp (IU g<sup>–1</sup>). The concentration of the surfactant applied to the pulp samples was 0.1% v/v. Each treatment was carried out with 10 g of pulp, at a consistency of 4%, in 2 L flasks and under agitation (250 rpm). Control treatments were prepared under the same conditions with inactivated enzymes (boiled for 20 min). Control and treated pulp samples were washed with deionized water after the treatments and filtered through a Büchner funnel with a Whatman #934-AH filter paper. The pulp samples were air-dried overnight to remove residual water before subsequent analysis. All pulp treatments were performed in triplicate.

### Laccase treatment of the process water samples

A pulp sample was filtered on a Büchner funnel with a Whatman #934-AH filter paper to recover the process water. A laccase treatment of this water

sample was carried at 60 °C, pH 5.0 for 2 h. The enzymatic dosage applied was 20 IU L<sup>-1</sup>. Each treatment was done with 200 mL in 1 L flasks and under agitation (250 rpm). Control treatments were performed under the same conditions with inactivated enzymes (boiled for 20 min). The treatments were carried out in triplicate.

#### Pulp and process water extractives recovery

Pulp extractives were obtained by a Soxhlet extraction carried out according to TAPPI standard procedure (T-280) using acetone as a solvent. The acetone containing extractives was partially evaporated and then made up to 50 mL. Process water extractives were obtained according to the method described by Orsa and Holmbom<sup>28</sup> with small modifications using methyl tertiary-butyl ether (MTBE) as a solvent. The MTBE containing extractives was partially evaporated and then made up to 300 µL.

#### Gas chromatography (GC)

100 µL samples were used for gas chromatography analysis. Extractives groups, including fatty and resin acids, sterols, steryl esters, triglycerides and lignans were measured as N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA, Supelco) derivatives by gas chromatography. GC–FID (flame ionization detection) analyses were performed on a Agilent 5890 series II gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with FID using a high-temperature capillary column (DB5-HT, 5 m × 0.25 mm ID, 0.1 µm film thickness; J&W Scientific, Folsom, Ca, USA). Nitrogen was used as the carrier gas. The samples were injected using an autoinjector (Agilent 7673) directly onto the column. The temperature of the injector was set to 300 °C. The oven was temperature-programmed with the following settings: 100 °C (1.5 min), then 100 °C to 340 °C at 10 °C min<sup>-1</sup> and finally 5 min hold at 340 °C. The temperature of the detector was set to 340 °C.

The GC–MS (mass spectrometry) analyses were performed on the same gas chromatograph model with a MS detector (Agilent 5972) using a MS capillary column (DB5-MS, 30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness; J&W Scientific). Nitrogen was used as the carrier gas. The samples were injected with an autoinjector (Agilent 7673) directly onto the column. The temperature of the injector was set to 250 °C. The oven was temperature-programmed as follows: 120 °C (2 min), then 120 °C to 180 °C at 10 °C min<sup>-1</sup>, followed by 180 °C to 245 °C at 3 °C min<sup>-1</sup>, 245 °C to 300 °C at 15 °C min<sup>-1</sup>, with a final stage of 7 min hold at 300 °C. Detector temperature was set to 300 °C. Compounds were identified by computer comparison of the mass spectra with those of standard compounds.

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Biochemical treatments of the softwood TMP

The parameters selected for analysis (pulp consistency, pH, temperature, incubation time) were chosen to be

as close as possible to the industrial conditions, by considering the stage at which the pulp samples were collected and where the biochemical treatments could be applied. The removal extents presented in this study were calculated with respect to the related incubation controls.

In Table 1, results demonstrate that the surfactant had a significant impact on five of the six extractives groups evaluated after a 2 h treatment at 60 °C. It removed 18% of the total fatty acids, 25% of the whole resin acids, 14% of the entire sterols, 27% of the full steryl esters and 26% of the overall triglycerides. Therefore, Surf acted successfully on a broad range of relevant substrates responsible for pitch deposits. This surfactant is a non-ionic alkyl diethanolamides compound that decreased surface tension and provides high detergency as well as dispersion. Compared with ethoxylates and nonylphenol surfactants, Surf has a low foaming profile. No anti-foaming agents are needed to prevent the redeposition of pitch particles. This characteristic is essential because it prevents technical problems in the pulp and paper process.

Results also demonstrate a great synergy between the surfactant and the lipase enzymes for pitch control.

**Table 1.** Pulp extractives removal by different biochemical methods after 2 h treatment at 60 °C

Extractives compounds	Removal (%)		
	Surf	M-Lip+	TvLac+
Lauric acid	~	~	~
Myristic acid	Tr	Tr	Tr
Palmitic acid	17	–12	28
Linoleic acid	18	–46	23
Oleic acid	18	–38	31
Linolenic acid	Tr	Tr	Tr
Stearic acid	73	92	67
<u>Total fatty acids</u>	18	–39	27
Pimaric acid	29	43	27
Sandacopimaric acid	Tr	Tr	Tr
Isopimaric acid	30	42	23
Palustric acid	Tr	Tr	Tr
Levopimaric acid	Tr	Tr	Tr
Dehydroabietic acid	23	42	15
Abietic acid	24	43	19
Neobietic acid	37	77	47
12-chlorodehydroabietic acid	Tr	Tr	Tr
14-chlorodehydroabietic acid	Tr	Tr	Tr
Dichlorostearic acid	17	51	10
Dichlorodehydroabietic acid	Tr	Tr	Tr
<u>Total resin acids</u>	25	48	23
Campesterol	18	20	13
β-Sitosterol	13	36	21
<u>Total sterols</u>	14	32	17
Total steryl esters	27	34	23
<u>Total triglycerides</u>	26	78	36
<u>Total lignans</u>	0	8	56

Surf: Surfactant; M-Lip+: Lipase+Surf; TvLac+: Laccase+Surf.

~: Not detected; Tr: Detected in trace amounts.

All standard deviations were below 10% of the mean value.

This combination allowed greater removal of the entire resin acids, sterols and triglycerides groups with 48%, 32% and 78% removal, respectively. However, this combination also generated a considerable increase in total fatty acids because of the hydrolysis of the triglycerides by the lipase enzymes. This rise in fatty acids is nonetheless lower than it was when the lipase was used alone (data not shown).

Since laccase enzymes can also act on a broad range of substrates, benefit from synergy with the surfactant treatment is expected as well.<sup>9,20,21,24</sup> In fact, this combination proved to be more efficient for the removal of the whole fatty acids (27%) and lignans group (56%) but it did not yield better results for the removal of resin acids or the other extractives groups. The enzyme did not seem to be affected by surfactant since those results are better than the laccase treatment alone (data not shown). A higher enzyme dosage also did not improve the results significantly, as was observed previously by other researchers.<sup>24</sup> The thermostability of the enzyme is not a limiting factor since it has a half-life of approximately 9 h at 60 °C.<sup>29</sup> It is possible that the pulp consistency may have lowered the enzyme efficiency by decreasing oxygen availability for this oxidoreductase or resulting in poorer accessibility of the different substrates. Other studies have suggested the use of mediators in conjunction with laccase to increase the extractives degradation process with this enzyme.<sup>22,23</sup> Although good results can be achieved by this process, it is important to note that this method results in the addition of more phenolic compounds into pulp manufacturing and process water. Further, since generally the use of mediators is costly, it decreases greatly the economic feasibility of the laccase application in the pulp and paper industry.

For pitch control it is essential to analyze the removal not only of the total extractive compounds but also of the individual groups since the extractives composition varies greatly from one wood species to another. Previous studies have shown that even if a treatment could remove up to 50% of the whole extractives, it did not reduce pitch problems during pulping because the lipophilic compounds responsible for the deposits were not degraded properly.<sup>1,7,30</sup> Triglycerides are considered to be the most problematic compounds during the manufacturing of mechanical and acidic sulfite pulps from various softwood species.<sup>31,32</sup> In Europe, lipases have been shown to reduce pulp triglycerides in laboratory and pilot-scale trials.<sup>31,33</sup> In Japan, mill-scale in-process treatments using commercial lipases have also reduced pitch problems.<sup>32</sup> Even if lipase treatment had some success in the control of glycerides, it does not degrade other extractives that also play a major part in pitch deposits.<sup>7,9,13</sup> By using a rigorous approach, it is demonstrated here that a surfactant–lipase combination can be an effective treatment for the removal of major extractive compounds responsible for pitch problems in thermomechanical pulps.

### Enzymatic treatment of the TMP process water

Considering that the pulp and paper industries are moving toward freshwater system closure, it is obvious that extractives build-up in the process water system will continue to be a major concern, especially for paper quality. The need to develop methods for water contaminant removal is imperative. Table 2 shows that a 2 h treatment of process water with laccase enzymes without mediator had a significant impact on almost all extractive groups evaluated. It removed 42% of the total fatty acids, 43% of the whole resin acids, 14% of the full sterol esters, 26% of the overall triglycerides and 60% of the entire lignans group. Others studies have also shown good results for process water decontamination with laccase enzymes.<sup>9,24</sup>

The exact mechanism that leads to decontamination of the process water by those enzymes still needs to be fully resolved. A hypothesis on the modification of linoleic acid and its esters has been described by Zhang *et al.* (2002).<sup>20</sup> The authors suggested that the mechanism was similar to that of lipoxygenase catalyzed reaction with linoleic acid derivatives, as peroxidation starts with the abstraction of a hydrogen atom from the linoleic acid in the presence of laccase, which then leads to the formation of a lipid radical (Fig. 1). The consequence of this is the rearrangement

**Table 2.** Process water extractives removal by laccase enzymes after 2 h treatment at 60 °C

Extractives compounds	Removal (%) TvLac
Lauric acid	~
Myristic acid	Tr
Palmitic acid	47
Linoleic acid	41
Oleic acid	43
Linolenic acid	Tr
Stearic acid	25
<u>Total fatty acids</u>	42
Pimaric acid	54
Sandacopimaric acid	Tr
Isopimaric acid	38
Palustric acid	Tr
Levopimaric acid	Tr
Dehydroabietic acid	25
Abietic acid	51
Neobietic acid	62
12-chlorodehydroabietic acid	Tr
14-chlorodehydroabietic acid	Tr
Dichlorostearic acid	9
Dichlorodehydroabietic acid	Tr
<u>Total resin acids</u>	43
Campesterol	18
$\beta$ -Sitosterol	2
<u>Total sterols</u>	4
<u>Total sterol esters</u>	14
<u>Total triglycerides</u>	26
<u>Total lignans</u>	60

TvLac: Laccase of *Trametes Versicolor*.

~: Not detected; Tr: Detected in trace amounts.

All standard deviations were below 10% of the mean value.



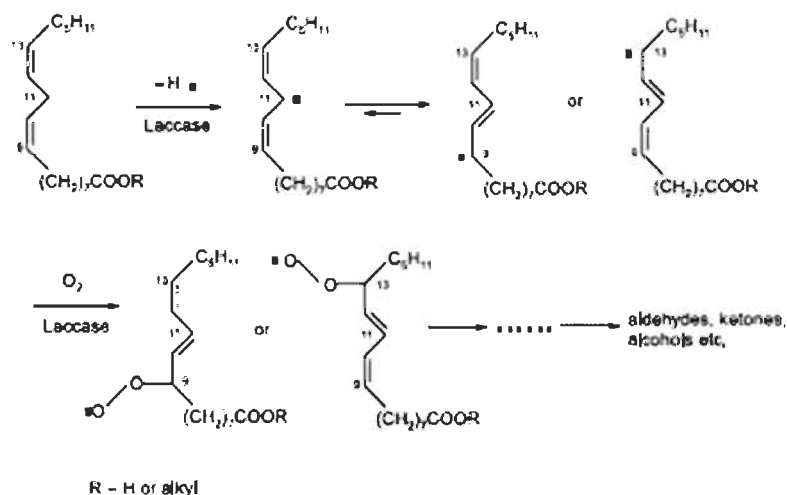


Figure 1. Proposed mechanism for the laccase-catalyzed modification of linoleic acid and its esters (adapted from Zhang *et al.*, 2002)<sup>20</sup>.

of the double bonds resulting in the formation of a conjugated diene. Since the latter compound is very susceptible to attack by molecular oxygen, it leads to the formation of peroxy radicals. These radicals can then undergo chain reactions to abstract a proton from an adjacent lipid molecule to form another hydroperoxide.

Even if the laccase treatment was not as efficient as one would have hoped for pulp extractives removal, the potential use of this class of enzyme should remain under consideration. If the whole pitch problem is considered, then the use of laccase enzymes in conjunction with surfactant-lipase treatment could ultimately be beneficial because of its significant impact on the process water.

## CONCLUSION

A pitch control solution has been developed for the pulp and paper industries through efficient green technologies. With enzyme-based approaches, ways to reduce extractives matters in pulp and process water have been developed. The efficiency of the methods was quantified using GC-MS and GC-FID, and results show that by combining a novel ecological surfactant with a new lipase, it is possible to efficiently reduce a broad range of extractive compounds in a softwood thermomechanical pulp. By combining the pulp treatment with laccase decontamination of the process water, this new method represents an efficient alternative to control pitch-associated problems.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canada research chair on value-added papers from the Centre Intégré en Pâtes et Papiers (Trois-Rivières, Canada), AgroTerra Biotech (Trois-Rivières, Canada), the Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier (Laval, Canada) and the

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## REFERENCES

- Gutierrez A, del Rio JC, Martinez MJ and Martinez AT, Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* Wood. *Appl Environ Microbiol* 65:1367–1371 (1999).
- Allen LH, Pitch control in pulp mills, in *Pitch Control, Wood Resin and Deresination*, ed. by Back EL and Allen LH. Tappi Press, Atlanta, pp. 265–287 (2000).
- Kontkanen H, Saloheimo M, Pere J, Miettinen-Oinonen A and Reinikainen T, Characterization of *Melanocarpus albomyces* steryl esterase produced in *Trichoderma reesei* and modification of fibre products with the enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:696–704 (2006).
- Burnes TA, Blanchette RA and Farrell RL, Bacterial biodegradation of extractives and patterns of bordered pit membrane attack in pine wood. *Appl Environ Microbiol* 66:5201–5205 (2000).
- Kallioinen A, Vaari A, Ratto M, Konn J, Siika-aho M and Viikari L, Effects of bacterial treatments on wood extractives. *J Biotechnol* 103:67–76 (2003).
- Kontkanen H, Tenkanen M, Fagerstrom R and Reinikainen T, Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations. *J Biotechnol* 108:51–59 (2004).
- Gutierrez A, del Rio JC, Jesus Martinez M and Martinez AT, The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends Biotechnol* 19:340–348 (2001).
- Martinez-Inigo MJ, Gutierrez A, del Rio JC, Martinez MJ and Martinez AT, Time course of fungal removal of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* wood. *J Biotechnol* 84:119–126 (2000).
- Zhang X, The effects of white-water dissolved and colloidal fractions on paper properties and effects of various enzyme treatments on the removal of organic components. *Pulp Paper Canada* 101-3:59–62 (2000).
- Dorado J, van Beek TA, Claassen FW and Sierra-Alvarez R, Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandera* sp. and *Trametes versicolor*. *Wood Sci Technol* 35:117–125 (2001).
- Stebbing DW, Zhang X, Soong G, Mansfield SD and Sadtler JN, Fungal enzyme treatment of newsprint mill white water: impact on white water and paper properties. *J Pulp Paper Sci* 30:3–8 (2004).

- 12 Blanco A, Negro C, Borch K, Mining S, Hannuksela T and Holmbom B, Pitch control in thermomechanical pulping and papermaking by enzymatic treatments, *Appita J* 58:5:358–361 (2005).
- 13 Bajpai P, Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog* 15:147–57 (1999).
- 14 Mayer AM and Staples RC, Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551–65 (2002).
- 15 Burton SG, Laccases and phenol oxidases in organic synthesis – a review. *Current Org Chem* 7:1317–1331 (2003).
- 16 Kenealy WR, Jeffries TW, Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments, in *Wood Deterioration and Preservation: Advances in our Changing World*, ed. by Goodell B, Nicholas DD and Schultz TP. *ACS symposium series* 845, Washington, pp 210–239 (2003).
- 17 Claus H, Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35:93–96 (2004).
- 18 Rodriguez Couto S and Toca Herrera JL, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv* 24:500–513 (2006).
- 19 Minussi RC, Pastore GM and Duran N, Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technol* 98:158–164 (2007).
- 20 Zhang X, Eigendorf G, Stebbing DW, Mansfield SD and Sadler JN, Degradation of trilinolein by laccase enzymes. *Arch Biochem Biophys J* 405:44–54 (2002).
- 21 Karlsson S, Holmbom B, Spetz P, Mustranta A and Buchert J, Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:317–20 (2001).
- 22 Gutierrez A, del Rio JC, Rencoret J, Ibarra D and Martinez AT, Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:845–851 (2006).
- 23 Gutierrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, *et al.*, Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ Sci Technol* 41:4124–4129 (2007).
- 24 Zhang X, Renaud S and Paice M, The potential of laccase to remove extractives present in pulp and white water from TMP newsprint mills. *J Pulp Paper Sci* 31:175–180 (2005).
- 25 Hurtubise Y, Shareck F, Kluepfel D and Morosoli R, A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol Microbiol* 17:367–377 (1995).
- 26 Kordel M, Hofmann B, Schomburg D and Schmid RD, Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J Bacteriol* 173:4836–4841 (1991).
- 27 Childs RE and Bardsley WG, The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* 145:93–103 (1975).
- 28 Örsa F and Holmbom B, A convenient method for the determination of wood extractives in papermaking process waters and effluent. *J Pulp Paper Sci* 20:361–366 (1994).
- 29 Jordaan J and Leukes WD, Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme Microbial Technol* 33:212–219 (2003).
- 30 Gutierrez A, del Rio JC, Gonzalez-Vila FJ and Martin F, Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *J Chromatog A* 823:449–455 (1998).
- 31 Fischer K and Messner K, Reducing troublesome pitch in pulp mills by lipolytic enzymes. *Tappi J* 75:130–134 (1992).
- 32 Fujita Y, Awaji H, Taneda H, Matsukura M, Hata K, Shimoto H, *et al.*, Recent advances in enzymatic pitch control. *Tappi J* 75:117–122 (1992).
- 33 Mustranta A, Fagernas L and Viikari L, Effects of lipases on birch extractives. *Tappi J* 78:140–146 (1995).

## CHAPITRE V

### SYNTHÈSE ET CONCLUSION

#### 5.1 Synthèse des développements biotechnologiques pour l'industrie du textile

La première laccase à avoir été étudiée provient de la souche *Rhus vernicifera* (Figure 5.1), un arbre japonais produisant de la laque (Yoshida, 1883), d'où découle l'origine du nom de cette enzyme.



**Figure 5.1** Photo de *Rhus vernicifera*.

La laccase, selon la définition donnée dans la nomenclature de la commission des enzymes, est une oxydoréductase agissant sur les groupes diphénols, ainsi que sur les composés similaires, en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électron (EC 1.10.3.2). Ce sont des metalloprotéines présentes principalement dans les plantes et dans les champignons mais aussi dans certaines bactéries (Alexandre et Zhulin, 2000; Claus, 2004; Sharma et al., 2007). La structure de la protéine agit en tant que ligand pour les atomes de cuivre, leur apportant une sphère de coordination où les changements d'états de réduction sont thermodynamiquement possibles. Les laccases contiennent un atome de cuivre de type 1 (T1), qui est associé au site d'oxydation des substrats, ainsi que trois cuivres additionnels : un type 2 (T2) et deux type 3 (T3) formant un groupe trinucéaire. Cette formation est associée au site où a lieu la réduction de l'oxygène moléculaire (Bertrand et al., 2002; Hakulinen et al., 2002; Piontek et al., 2002; Enguita et al., 2003).

Les laccases sont particulièrement intéressantes d'un point de vue industriel à cause de leur habileté à oxyder une vaste gamme de substrats phénoliques. Diverses recherches sont effectuées dans différents secteurs d'intérêts : le textile, les pâtes et papiers, l'alimentation, les cosmétique, la décontamination des sols et de l'eau, les biosenseurs, les biocarburants et la synthèse organique (Mayer et Staples, 2002; Burton 2003; Kenealy et Jeffries, 2003; Claus 2004; Rodriguez Couto et al., 2006; Minussi et al., 2007). Le Tableau 5.1 présente une revue de littérature des principales applications de la laccase.

Quelques produits commerciaux, à base de laccase, sont déjà disponibles sur le marché : le Denilite I et II de Novozymes (tiré du site internet de Novozyme) et le Zylite de Zytex (tiré du site internet de Zylite) en sont de bons exemples. Ces produits sont utilisés dans l'industrie du textile pour le blanchiment du denim. Normalement, des médiateurs sont utilisés en combinaison avec l'enzyme pour améliorer l'efficacité du produit. Une fois oxydés par l'enzyme, les médiateurs agissent en tant que pièges d'électrons et attaquent les encres, créant ainsi le blanchiment du denim (Camarero et al., 2005; Moldes et Sanroman, 2006).

**Tableau 5.1** Synthèses des différentes applications de la laccase

Secteur d'application	Source de laccase	Référence
Industrie du textile (Décoloration des encres)	Aspergillus sp.	Soares et al. (2001a)
	Aspergillus sp.	Soares et al. (2001b)
	Aspergillus niger	Soares et al. (2002)
	Cerrena unicolor	Michniewicz et al.
	(2003)	
	Corioloopsis gallica	Reyes et al. (1999)
	Corioloopsis rigida	Gómez et al. (2005)
	Funalia trogii	Ünyayar et al. (2005)
	Irpex lacteus	Kasinath et al. (2003)
	Myceliophthora thermophila,	
	Polyporus pinsitus,	
	Trametes versicolor	Claus et al. (2002)
	Pleurotus eryngii,	
	Pycnoporus cinnabarinus,	
	T. versicolor	Camarero et al. (2004)
	Pleurotus ostreatus	Hou et al. (2004)
	P. ostreatus	Palmieri et al. (2005)
	P. cinnabarinus	Mccarthy et al. (1999)
	P. cinnabarinus	Schliephake et al. (2000)
	Sclerotium rolfsii,	
	Trametes hirsuta	Campos et al. (2001)
	Streptomyces cyaneus	Arias et al. (2003)
	T. hirsuta	Abadulla et al. (2000)
	T. hirsuta	Dominguez et al. (2005)
	T. hirsuta	Moldes et al. (2003)
	T. hirsuta	Rodríguez Couto et al. (2004a)
	T. hirsuta	Rodríguez Couto et al. (2004c)
	T. hirsuta	Rodríguez Couto et al. (2005a)
	T. hirsuta	Rodríguez Couto et al. (2006a)
	T. hirsuta	Rodríguez Couto et al. (2006b)
	T. hirsuta	Rodríguez Couto et al. (2005b)
	T. hirsuta, T. versicolor	Rodríguez Couto et al. (2004b)
	Trametes modesta	Nyanhongo et al. (2002)
	T. modesta	Rehorek et al. (2004)
	Trametes trogii	Levin et al. (2005)
	T. versicolor	Maceiras et al. (2001)
	T. versicolor	Lorenzo et al. (2002)
	T. versicolor	Rodríguez Couto et al. (2002)
	T. versicolor	Peralta-Zamora et al. (2003)
	T. versicolor	Blánquez et al. (2004)
	T. versicolor	Tavares et al. (2004)
	Trametes villosa	Zille et al. (2003)
(Décoloration du denim)	T. villosa	Knutson et Ragauskas (2004)
	T. versicolor	Pazarhoglu et al. (2005)
	Non spécifiée	Vinod (2001)

**Tableau 5.1** Synthèses des différentes applications de la laccase (Suite)

Secteur d'application	Source de laccase	Référence
Industrie de l'alimentation (Applications variées)	Chinese rhus lacquer Myceliophthora thermophila, P. pinsitius P. cinnabarinus T. hirsuta T. versicolor Non spécifiée Non spécifiée Non spécifiée	Huang et al. (1995)  Micard et Thibault (1999) Georis et al. (2003) Kuuva et al. (2003) Crecchio et al. (1995) Mathiasen (1996) Petersen et Mathiasen (1997) Norsker et al. (2000)
Industrie papetière (Mise en pâte biologique)	Fomes fomentarius, Ganoderma collosum, Lentinus edodes, Merulius tremellosus, Phlebia radiata, P. ostreatus, T. versicolor C. versicolor Peniophora sp., Pycnoporus sanguineus, T. hirsuta, T. versicolor T. versicolor T. versicolor Non spécifiée Non spécifiée Non spécifiée Non spécifiée Non spécifiée	     Bourbonnais et al. (1997) Call et Mücke (1997)   Kandioller et al. (2001) Archibald et al. (1997) Crestini et al. (1998) Jacob et al. (1999) Sealey et al. (1999) Chakar et Ragauskas (2001) Poppius-Levlin et al. (2001) Tamminen et al. (2003)
(Bioblanchiment)	C. versicolor P. eryngii, P. cinnabarinus, T. versicolor P. cinnabarinus T. versicolor T. versicolor Non spécifiée Non spécifiée	Balakshin et al. (2001)  Camarero et al. (2004) Georis et al. (2003) Paice et al. (1995b) Archibald et al. (1997) Balakshin et al. (2001) Han et al. (2002)
Industries variées (Traitement des eaux usées)	C. gallica Gliocladium virens Lentinula edodes (1999) L. edodes L. edodes P. tigrinus P. ostreatus Pleurotus spp. Pycnoporus coccineus	Calvo et al. (1998) Murugesan (2003) D'Annibale et al.  D'Annibale et al. (2000) Casa et al. (2003) D'Annibale et al. (2004) Aggelis et al. (2003) Tsioulpas et al. (2002) Jaouani et al. (2005)

**Tableau 5.1** Synthèses des différentes applications de la laccase (Suite)

Secteur d'application	Source de laccase	Référence
Industries variées (Traitement des eaux usées)	<i>R. vernicifera</i>	Durante et al. (2004)
	<i>Trametes</i> sp. strain AH28-2	Xiao et al. (2003)
	<i>T. versicolor</i>	Jolival et al. (2000)
	<i>T. versicolor</i>	Edwards et al. (2002)
	<i>T. versicolor</i>	Lucas et al. (2003)
Dégradation de composés xénobiotiques	Strain I-4 (Chaetomiaceae)	Saito et al. (2004)
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Potin et al. (2004)
	<i>Coprinus cinereus</i> ,	
	<i>Myceliophthora thermophila</i> ,	
	<i>P. pinsitus</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Kulys et al. (2003)
	<i>C. gallica</i>	Pickard et al. (1999)
	<i>C. gallica</i>	Vandertol-Vanier et al. (2002)
	<i>Coriolus hirsutus</i>	Cho et al. (2002)
	<i>Coriolus versicolor</i>	Itoh et al. (2000)
	<i>C. versicolor</i>	Okazaki et al. (2002)
	<i>Myceliophthora thermophyla</i> ,	
	<i>Trametes pubescens</i>	Nicotra et al. (2004)
	<i>Panus tigrinus</i>	Zavarzina et al. (2004)
	<i>P. osteratus</i>	Eggen (1999)
	<i>P. ostreatus</i>	Hublik et Schinner (2000)
	<i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i>	Keum et Li (2004)
	<i>P. cinnabarinus</i>	Mougin et al. (2002)
	<i>Pyricularia oryzae</i>	Lante et al. (2000)
	<i>P. oryzae</i>	Carunchio et al. (2001)
	<i>Rhus vernicifera</i>	Moeder et al. (2004)
	<i>T. hirsuta</i>	Niku-Paavola et al. (2000)
	<i>T. hirsuta</i> D10	Böhmer et al. (1988)
	<i>Trametes</i> sp.	Tanaka et al. (2001)
	<i>Trametes</i> sp.	Tanaka et al. (2003)
	<i>T. versicolor</i>	Collins et al. (1996)
	<i>T. versicolor</i>	Johannes et al. (1998)
	<i>T. versicolor</i>	Majcherczyk et al. (1998)
	<i>T. versicolor</i>	Johannes et al. (2000)
	<i>T. versicolor</i>	Majcherczyk et al. (2000)
	<i>T. versicolor</i>	Castro et al. (2003)
	<i>T. versicolor</i>	Dodor et al. (2004)
	<i>T. villosa</i>	Fabbrini et al. (2001)
	<i>T. villosa</i>	Fukuda et al. (2001)
	<i>T. villosa</i>	Kang et al. (2002)
	<i>T. villosa</i>	Cantarella et al. (2003)
	<i>Trichophyton</i> sp. LKY-7	Jung et al. (2003)
	Non spécifiée	Zhang et al. (2002)

**Tableau 5.1** Synthèses des différentes applications de la laccase (Suite)

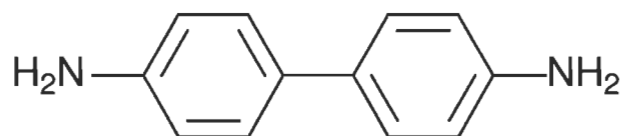
Secteur d'application	Source de laccase	Référence
Industrie des cosmétiques (Applications variées)	Non spécifiée Non spécifiée Non spécifiée Non spécifiée	Roure et al. (1992) Aaslyng et al. (1996) Lang et Cotteret (1999) Golz-Berner et al. (2004)
Biosenseurs	Agaricus bisporus, A. niger, T. versicolor Agaricus bisporus, R. vernicifera Rigidoporus lignosus, T. versicolor Aspergillus oryzae, Myceliophthora Thermophila, P. pinsitus C. unicolor C. unicolor C. hirsutus C. hirsutus C. hirsutus C. hirsutus C. hirsutus C. hirsutus C. hirsutus, R. vernicifera C. versicolor P. ostreatus P. oryzae R. vernicifera T. versicolor T. versicolor T. versicolor T. versicolor T. versicolor T. versicolor T. villosa	Timur et al. (2004) Vianello et al. (2004) Kulys et Vidziunaite (2003) Jarosz-Wilkolazka et al. (2004) Jarosz-Wilkolazka et al. (2005) Marko-Varga et al. (1995) Lisdar et al. (1997) Bauer et al. (1999) Kuznetsov et al. (2001) Freire et al. (2002) Gupta et al. (2003) Gomes et Rebelo (2003) Leite et al. (2003) Palmore et Kim (1999) Gardioli et al. (1996) Leech et Daigle (1998) Freire et al. (2001) Gomes et Rebelo (2004) Haghighi et al. (2003) Roy et al. (2005) Ferry et Leech (2005)
Synthèse organique	C. hirsuta C. hirsutus P. cinnabarinus P. coccineus P. oryzae T. versicolor T. versicolor T. versicolor T. versicolor T. villosa	Baker et al. (1996) Karamyshev et al. (2003) Mikolasch et al. (2002) Uyama et Kobayashi (2002) Setti et al. (1999) Fritz-Langhals et al. (1998) Akta et al. (2001) Schäfer et al. (2001) Akta et Tanyolaç (2003) Uchida et al. (2001)



La majorité des laccases caractérisées jusqu'à présent ont été extraites de champignons lignolytiques (Leonowicz et al., 2001). Cependant, les laccases sont également retrouvées fréquemment dans le règne des procaryotes. Étonnamment, seulement un faible nombre d'informations scientifiques ont été publiées à ce sujet (Alexandre et Zhulin, 2000; Claus, 2004; Sharma et al., 2007). La laccase bactérienne la plus étudiée jusqu'à présent est CotA, une composante des spores de *Bacillus subtilis* (Hullo et al., 2001; Martin et al., 2002; Enguita et al., 2003). La laccase bactérienne de *B. Subtilis* (CotA) et celle de *Streptomyces lavendulae* REN-7 (STSL) sont celles qui ont les plus grandes stabilités thermiques de toutes les laccases étudiées (Martin et al., 2002; Suzuki et al., 2003). Malgré une telle stabilité thermique et les nombreux avantages offerts par la production enzymatique en système procaryote vs eucaryote, l'utilisation industrielle de laccases bactériennes n'est présentement pas viable à cause du faible rendement de production de ces enzymes (Martins et al., 2002; Endo et al., 2003; Suzuki et al., 2003). L'amélioration de la production des laccases aurait un impact important sur l'utilisation de ces enzymes dans une variété d'applications industrielles dont celles liées à l'industrie du textile.

Récemment une laccase a été retrouvée dans la souche *Streptomyces coelicolor*, une bactérie Gram positive retrouvée dans les sols, et elle a été partiellement caractérisée (Machczynski et al., 2004). Malgré son faible potentiel d'oxydoréduction, cette enzyme démontre des caractéristiques intéressantes : elle est relativement petite (~32 kDa) et possède une forte activité enzymatique dans des conditions alcalines (Machczynski et al., 2004). En comparaison, la majeure partie des laccases fongiques sont principalement actives sous conditions acides (Sharma et al. 2007). La laccase de *Streptomyces coelicolor* pourrait oxyder efficacement une variété de composés phénoliques, en conditions alcalines, et être développée pour différentes applications commerciales.

L'industrie du textile est le principal utilisateur d'encre et de colorants, mais ce type de composés est également présent dans l'industrie de l'alimentation, de la pharmaceutique, de l'impression et des cosmétiques. Les encres et les colorants conservent leur couleur et leur intégrité structurelle lorsqu'ils sont exposés à la lumière du soleil et ils sont très résistants à la dégradation microbienne (Hao et al., 1999; Kandelbauer et Guebitz, 2005). À cause de ces propriétés, plusieurs de ces composés se retrouvent dans l'environnement via les systèmes de traitement des eaux usées industrielles. Certains sont créés à partir de composés aromatiques cancérigènes tel que la benzidine (Baughman et Perenich, 1988) (Figure 5.2). Il n'est donc pas surprenant que ces composés soient devenus une préoccupation majeure pour la santé humaine et pour l'environnement. Ainsi, le développement de biotechnologies enzymatiques, à base de laccase, est une avenue attrayante étant donné les capacités de cette enzyme à dégrader diverses structures chimiques similaires aux encres commerciales (Abadulla et al., 2000; Blázquez et al., 2004; Hou et al., 2004; Rodríguez Couto et al., 2004a; Rodríguez Couto et al., 2005b).



**Figure 5.2** Structure chimique de la benzidine.

Lors de mes travaux, nous avons cloné et isolé le gène de la laccase de *Streptomyces coelicolor* pour investiguer son utilisation potentielle dans diverses applications industrielles. Le premier objectif de mes travaux était de me concentrer sur le développement d'un système d'expression procaryote efficace dans *Streptomyces*. Les gènes de laccase sont généralement faiblement exprimés dans leur hôte d'origine, c'est d'ailleurs un des principaux obstacles à l'utilisation industrielle des laccases (Rodríguez Couto et al. 2006), mais de récentes études ont démontré un

bon potentiel pour un meilleur niveau d'expression (Lomascolo et al., 2003; Alves et al., 2004). Le niveau maximum de production de laccase, relevé dans la littérature, a été obtenu par la souche *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. Dans cette étude, l'éthanol a été utilisé comme inducteur pour l'expression. Un rendement de production variant entre 1.0 et 1.5 g L<sup>-1</sup> fut obtenu (Lomascolo et al. 2003). Dans une autre étude avec *P. cinnabarinus*, un rendement similaire fut également obtenu (de 1.0 à 1.2 g L<sup>-1</sup>, Alves et al., 2004). Dans ce cas, le gène homologue fut régulé par le promoteur du gène de la glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GPD) de *Schizophyllum commune*. Comparativement à ces niveaux d'expression, les rendements de production de laccases bactériennes sont extrêmement limités. Par exemple, la productivité de la laccase par *Streptomyces lavendulae* est très faible (un rendement de 0.045 mg g<sup>-1</sup> mycelia fut obtenu) (Suzuki et al. 2003). Lorsque produite dans *Escherichia. coli*, l'expression de cette laccase augmente à 30 mg L<sup>-1</sup> mais la protéine recombinante forme des agrégats et est conséquemment très difficile à purifier (Suzuki et al. 2003). La production hétérologue de la laccase de *Bacillus subtilis* dans *E. coli* a également été défavorisée par une importante agrégation intracellulaire, résultant en seulement 10% de rendement (Martins et al. 2002). Selon la littérature, notre méthode de production est le premier système d'expression à haut rendement pour une laccase bactérienne. Des cultures liquides en erlenmeyer ont produit une quantité considérable de laccase de *Streptomyces coelicolor* (350 mg L<sup>-1</sup>), nommée SLAC, avec un excellent niveau de pureté (90-95%) (Figure 2.1). Étant donné que la protéine est sécrétée dans le milieu de culture, aucun système majeur de purification n'est requis. Des rendements supérieurs sont attendus avec des cultures en fermenteur. Ce système d'expression bactérien à l'avantage d'être relativement simple d'utilisation en comparaison à un système d'expression fongique.

À cause de la faible quantité d'informations disponibles sur la laccase de *Streptomyces coelicolor* (Machczynski et al., 2004), le second objectif de mes recherches a été de caractériser cette laccase plus en profondeur afin de déterminer

ses capacités d'activités et de stabilités sous différentes conditions (pH et température) ainsi que sa résistance à divers inhibiteurs.

L'activité de SLAC est remarquable car elle permet l'oxydation de divers substrats phénoliques sous une vaste gamme de pH. Cette enzyme a démontré un optimum d'oxydation à pH 4.0 pour un composé tel que l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) alors qu'un autre composé tel que le DMP (2,6-diméthoxyphénol) a un optimum à pH 9.0 (Figure 2.2). En comparaison, des études sur des laccases de champignons démontrent un pH optimum acide pour l'oxydation du DMP (Slomczynski et al., 1995; Perie et al., 1998; Galhaup et al., 2002; Madzak et al., 2006). Étant donné que SLAC est également stable sous une vaste gamme de pH (3.0 à 9.0), elle est une enzyme de choix pour diverses applications industrielles potentielles, spécialement pour des applications où l'alcalinité limite l'utilisation de laccase normalement active en condition acide.

De plus, la laccase de *Streptomyces coelicolor* possède également une bonne thermostabilité comparativement à celle de *Trametes versicolor* (Figure 2.3). Elle possède une demi-vie de 10 min à 90°C et 120 min à 70°C. D'autres laccases thermostable ont également été publiées (Chefetz et al., 1998; Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2003) et la thermostabilité de SLAC est relativement comparable à celle de *Streptomyces lavendulae* REN-7 laccase (STSL) (Suzuki et al., 2003), mais ces enzymes ne sont pas similaires d'un point de vue génétique et possèdent ainsi un très faible pourcentage d'identité (16%) (Figure 5.3). La forte tolérance à la chaleur de SLAC est également un point important pour de futures applications industrielles.

Une autre propriété remarquable de SLAC, comparativement à d'autres laccases connues, est sa grande résistance à divers inhibiteurs conventionnels de la laccase. Alors que la laccase de *Trametes versicolor* ou *Streptomyces lavendulae* sont complètement inhibées par 1 mM d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) (Suzuki et al., 2003),

SLAC demeure 100% active. L'enzyme conserve également une bonne activité lorsque la concentration de  $\text{NaN}_3$  est augmentée à 10 mM (Tableau 2.1).

Summary of alignment results:

Total length of aligned sequences with gaps: 655 aas  
 Matching bases: 106 / 655 (16%)  
 Gaps: 336 / 655 (51%)

```

B-Lac19      1 mdrgrfnrrvllggaaaatslsiapevagaapaakgitarta--paggevrh-----
STSL         1 --mtdiieritdglagaardaapaaadgeltpyaapltvppvlrpdstdvlreteialrp

B-Lac19      51 --lkmyaekladggmggygfekgkasvpgplievnegdtlhieftntmdvraslhvhgldy
STSL         59 twvrlhqpqlpptlmwgyg----gsvpgptvevrrgqrvriawtnripkgseyptavev

B-Lac19     109 eissdg--tamnksdvepgg--trtytwr-thkpgriddgt---wrpgsagy-----
STSL        114 paanpnpsteggrggvppiadvaaalpawtvthlhgaqtgggndgwadnavgygdaqlsey

B-Lac19     153 -----whyhdhuvvgtehggtggrnglygpvivrrkgd---vlpdathtivf-----
STSL        174 pndhgavgwwhydhannvtr--wnvhtglygtylvrddeedalqlpsgkreiblriadrn

B-Lac19     196 ----ndmtinnr-----kphtgp-----
STSL        232 ldtddedgalngrllhktvivqeknpetgkpvsvpfagpyttvngriwpyaevdaawhrfr

B-Lac19     292 -----
STSL        292 lvnasnariydlvlidddrpvpvgvlhgqgsdggllprpvpvdfdealptltvapaermd

B-Lac19     210 ---dfeatvgdrveivmthge-----yyhtfhm-----
STSL        352 llidfralagrllrlvnkgagagpvpdpannvryphvmefrvgecgtdpfpelpevlsg

B-Lac19     236 -----hghr-----w-----ad-----nrtgi
STSL        412 sfrllthdiehggrllivltppatkgggghpeiwmtevedaeqvelpadgviqlmssega

B-Lac19     248 ltgpdpsrvid-----nkitgpa-----dsf
STSL        472 lktyrtrstfndgigftvaegsyeqwsflnlavnpvvhpmhihladfqlgrdtydvs

B-Lac19     270 gfqiiagegvga-----gawmyhc
STSL        532 gfdvtag-gtraplapdpdpvplppnerykdvfraipggmlrvmgfrfdgaggrfmyhc

B-Lac19     289 hvqshsdmgmvglflvkkpdgtipgyephehgataksgesgaptggaaaheneh
STSL        591 hllehedmgmrpfvvpmaeam----kfdhg----aghggh--gghgghgg--

```

**Figure 5.3** Alignement global des acides aminés de la séquence de SLAC (B-Lac19) vs STSL utilisant une matrice Blosum 62. Les régions d'identité entre les séquences sont indiquées en jaune. Un trait pointillé indique un gap introduit dans les séquences.

Il est intéressant de noter qu'EpoA, une laccase de *Streptomyces griseus*, possède également une forte résistance envers certains inhibiteurs (Endo et al. 2003). La séquence génétique d'EpoA suggère une homologie avec celle de SLAC (71%) (Figure 5.4). La structure protéique particulière de ces enzymes, possiblement reliée au niveau du site des cuivres T2/T3 (centre trinuléaire), doit favoriser cette résistance.

Une investigation approfondie de la structure cristalline de ces protéines pourrait nous éclairer sur le sujet.

```

Summary of alignment results:
  Total length of aligned sequences with gaps: 354 aas
  Matching bases: 252 / 354 (71%)
  Gaps: 17 / 354 (4%)

B-Lac19      1 mdrrgfnrrvllggaaaa----tslsiapevagaapaakgitartapaggevrhlkmyae
EpoA         1 mdrtrfrrmlvggaaaaatgvtslslgaveassaen---pprtapaggvvrllkmyae

B-Lac19      57 kladggmggygfekgkasvpgplievnegdtlhieftntmdvraslhvhgldyeissdgt
EpoA         57 klpngelgygfekgkasipgplielnegdtvhiefknltvdaslhvhgvdydiandgtr

B-Lac19     117 mnksdvepggtrtytwrthkpgrddgtwrpgsagywhydhvvgtehggtggrnglygp
EpoA        117 mnkshvepggtrtytwrthapgrkdgtypgsagywhydhvvgtdhgtgggirkglygp

B-Lac19     177 vivrrkgdvlpdathivfndmtinnrkphtgpdfeatvgdrveivmthgeyyhtfhh
EpoA        177 vvrrkgdilpdgtctvfvndmminnktahnsvnfeatvgdrlefvmitthgefyhtfhih

B-Lac19     237 ghrwadnrtgiltgpdpsrvidnkitgpadsfgfqiilageqvgagawmyhchvqshsdm
EpoA        237 ghrwadnrtgiltgpdpsrvigqqlrprdsyglqiiaqervgagawmyhchvqshsdm

B-Lac19     297 gmvglflvkkpdgtipgyephehgatak-sgesg-----eptggaahheh
EpoA        297 gmagllllikkadgtipgyephaaggtekkagakaganadkaakgaahqh--

```

**Figure 5.4** Alignement global des acides aminés de la séquence de SLAC (B-Lac19) vs EpoA utilisant une matrice Blosum 62. Les régions d'identité entre les séquences sont indiquées en jaune. Un trait pointillé indique un gap introduit dans les séquences.

Étant donné que les capacités de décoloration de cette laccase bactérienne n'ont jamais été étudiées auparavant, un autre de mes objectifs de recherche était de déterminer si cette enzyme pouvait être utilisée dans l'industrie du textile. Les applications industrielles visées sont le blanchiment du denim ainsi que la réduction de l'impact des encres et colorants dans l'environnement par le biais du traitement des effluents industriels. Étant donné que la plupart des eaux usées des industries du textile sont caractérisées par des pH variant de neutre à alcalin (pH 7.0 à 11.0) (Manu et Chaudhari, 2002; Jahmeerbacus et al., 2004), le potentiel d'utilisation de SLAC est avantageux comparativement aux laccases acides typiques qui ne sont généralement pas active dans cette gamme de pH.

Il y a plusieurs milliers d'encre et colorants disponibles commercialement et plus de  $7 \times 10^5$  tonnes de produits dérivés sont créés annuellement (Robinson et al., 2001). La coloration des eaux usées est une conséquence de l'industrie de fabrication des encres et colorants ainsi que de l'industrie du textile qui les utilisent fortement. Deux pour cent de la production mondiale des encres sont relarguées directement dans les effluents industriels et 10% sont également perdus durant leur utilisation dans les procédés de coloration des entreprises textiles (Pearce et al., 2003). La principale raison de la perte des encres dans les procédés de coloration est l'utilisation ou l'adhésion incomplète de ces dernières sur les fibres végétales et synthétiques. Les pertes varient d'un type d'encre à un autre et dépendent aussi de la classification de ces derniers (Blackburn, 2004). Plus de 20% de la masse initiale d'encre de type acide peut être perdue dans le procédé de coloration, plus de 30% pour les encres de type direct et plus de 50% pour celles de type réactif. Les encres réactives représentent environs 30% du marché total des encres et colorants (Pearce et al., 2003). Leur impact sur l'environnement est donc considérable. L'indigo carmine est un exemple courant d'encre acide retrouvée en abondance dans ce marché. Cette encre est utilisée fréquemment pour la coloration des jeans et des vêtements de travail en coton.

Des études ont démontré que les laccases pouvaient dégrader différentes variétés d'encres comme le type azo, anthraquinoïde, triarylméthane et indigoïde (Claus et al., 2002; Camarero et al., 2005). L'étude des capacités de décoloration de SLAC a démontré qu'elle était capable d'oxyder plusieurs types d'encres dont le type azo, diazo, anthraquinoïde et indigoïde (Tableau 3.1). En 5 heures, sous un pH légèrement alcalin (pH 9.0), l'enzyme seul a permis de décolorer de 11 à 40% les diverses encres à l'étude (reactive blue 19, direct sky blue 6b, acid blue 74, reactive black 5 et le congo red.). L'indigo carmine (AB74) fut l'encre la plus facilement oxydée.

L'utilisation de médiateurs, petites molécules capables d'agir comme médiateur d'oxydation entre la laccase et son substrat, a ouvert de nouvelles possibilités pour l'industrie du textile car ce système a permis l'amélioration de l'efficacité de la cinétique de cette enzyme envers les encres (Claus et al., 2002; Camarero et al., 2005). Tel que mentionné précédemment, des formulations commerciales de laccase-médiateur sont déjà utilisées dans l'industrie du textile pour décolorer le denim (Figure 5.5).



**Figure 5.5** Décoloration du denim par le biais d'un système laccase-médiateur. A) Denim original B) Denim décoloré avec le produit IndiStar de Genencor Inc (Tiré du site internet de Genencor Inc).

Une étude scientifique a démontré que le syringaldéhyde et l'acétosyringone étaient les deux meilleurs médiateurs pour l'oxydation des encres (Camarero et al., 2005). Lors de mes recherches, j'ai évalué la décoloration de l'indigo carmine en utilisant SLAC en combinaison avec divers médiateurs synthétiques et naturels (HBT, HBA, TEMPO, syringaldéhyde et acétosyringone). Mes résultats ont démontré que l'utilisation combinée de la laccase avec le HBT, le HBA ou le TEMPO n'étaient pas plus efficace que l'utilisation de l'enzyme seule (Figure 3.3). Ces faibles résultats

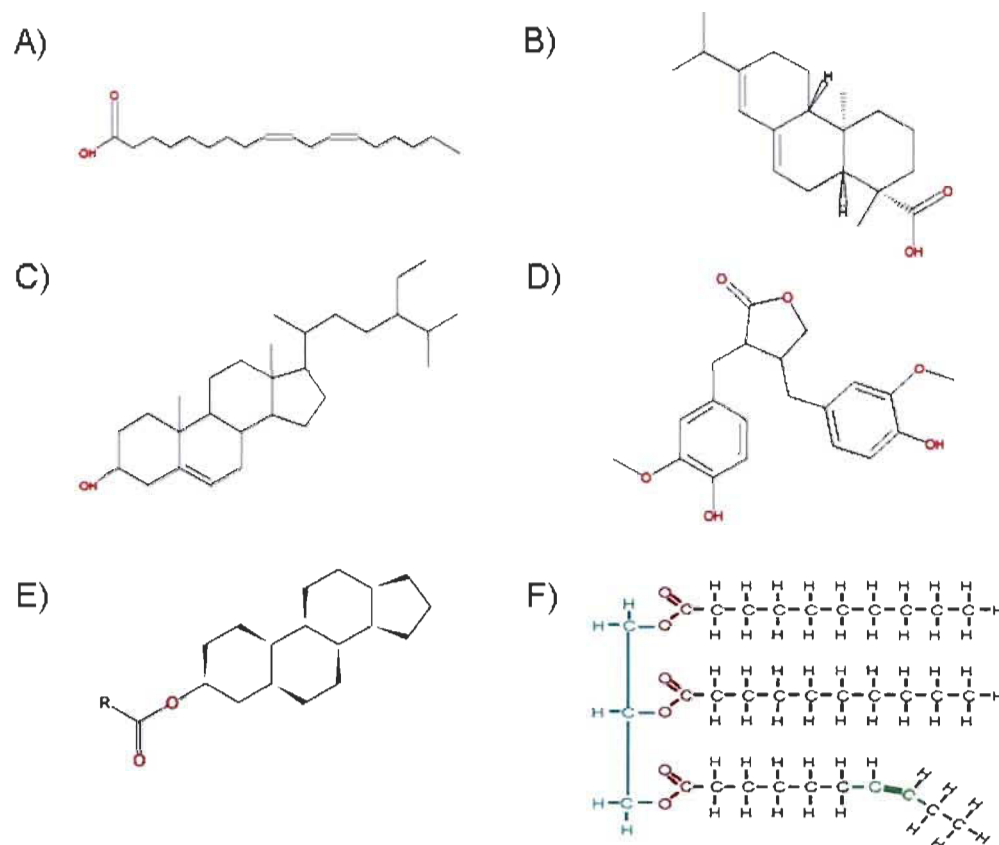


peuvent être attribués au faible potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme. Néanmoins, les résultats démontrent également que le syringaldéhyde et l'acétosyringone sont les meilleurs médiateurs pour cette enzyme, dans un contexte de décoloration des encres (Figure 3.2). Étant donné que ces deux médiateurs sont impliqués dans la dégradation naturelle de la lignine par des champignons de type pourritures blanches, ils sont considérés des médiateurs naturels et non synthétiques (Camarero et al., 2007). L'utilisation de médiateurs naturels aura des avantages environnementaux et économiques pour de futures applications industrielles. Mes résultats ont démontré que dans tous les cas la combinaison SLAC-Acétosyringone a été capable de rapidement oxyder, à divers degrés, toutes les encres à l'étude (Tableau 3.1). En 10 minutes, une décoloration de 94% a été obtenue pour l'indigo carmine (AB74), 91% pour le bleu de Chicago (DSB6b) et 65% pour le RB5. De plus, en 60 min, une décoloration de 21% a été obtenue pour le RB19 et 39% pour le rouge de Congo. La combinaison SLAC-Syringaldéhyde a également fonctionné mais de façon moins efficace (Tableau 3.1). Après un traitement de 60 min, l'encre RB19 et le rouge de Congo n'ont pas été décolorés par ce système. Par contre, ce système a bien fonctionné pour le bleu de Chicago et l'indigo carmine. Une décoloration de 64 à 66% a été obtenue pour un traitement de 10 minutes. La combinaison SLAC-acétosyringone semble donc avoir un potentiel certain pour des applications industrielles dans l'industrie du textile.

## 5.2 Synthèse des développements biotechnologiques pour l'industrie papetière

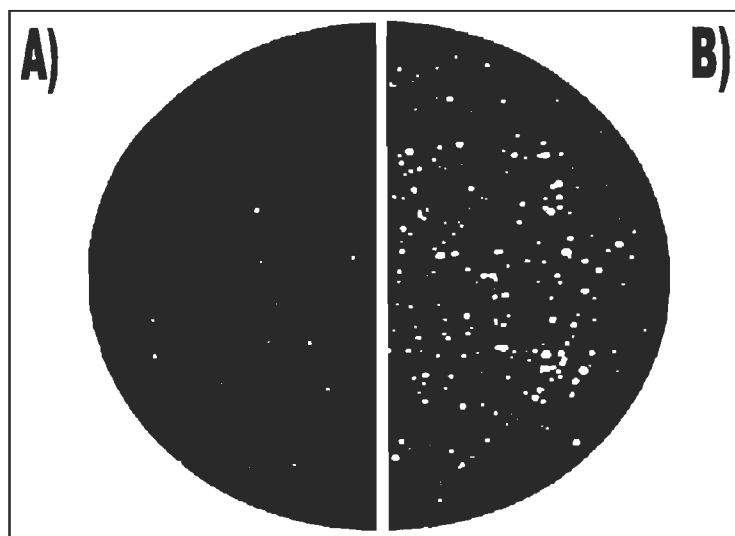
La déposition de la poix (wood pitch) est un problème complexe qui a augmenté avec l'introduction de nouvelles pratiques dans l'industrie papetière, tel que la fermeture des circuits d'eau fraîche et le recyclage du papier (Gutierrez et al., 1999; Allen, 2000). Le terme "poix" est appliqué aux matières extractibles du bois et aux dépôts de ces particules colloïdales qui sont créés durant les procédés de mise en pâte et la fabrication du papier (Allen, 2000; Kontkanen et al., 2006). Selon

l'association technique de l'industrie des pâtes et papiers, le concept de matières extractibles du bois réfère à un large nombre de composés qui sont solubles dans des solvants organiques. Les principaux constituants de ses matières extractibles sont les acides résiniques, les acides gras libres, les triglycérides, les stérols et esters de stérols (Gutierrez et al., 1999; Burnes et al., 2000; Kallioinen et al., 2003; Kontkanen et al., 2004). Des exemples sont présentés à la figure 5.6. En plus des matières extractibles



**Figure 5.6** Exemples de matières extractibles évaluées dans cette étude. a) acide linoléique, b) acide abiétique, c) beta-sitostérol, d) matairésinol, e) ester de stérol et f) triglycéride.

non-polaires, les produits de dégradations tels que les tannins et les petits fragments de lignine sont aussi décrits comme étant des composés communs de la poix du bois (Kallioinen et al., 2003). Dans les procédés papetiers, une forte déposition de la poix peut réduire l'efficacité des systèmes de lavage, augmenter la concentration de saletés ainsi que la consommation d'agents de blanchiment en plus de réduire la blancheur du papier diminuant ainsi sa qualité (Gutierrez et al., 2001) (Figure 5.7). Une forte concentration d'acides résiniques, provenant de la décharge d'effluents papetiers, génère aussi des problèmes de toxicité envers les poissons et autres organismes (Burnes et al., 2000). Tous ces impacts engendrent des pertes économiques pour l'industrie papetière et accroissent les préoccupations pour l'environnement. Ces pertes économiques peuvent représenter 1% des ventes de l'entreprise (Gutierrez et al., 2001).



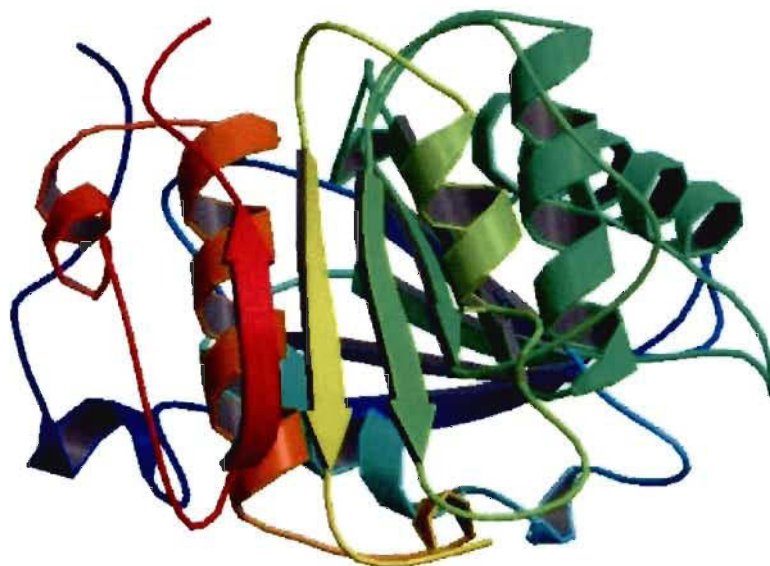
**Figure 5.7** Impact de la poix sur la qualité de fabrication de papiers recyclés. A) Papier avec contrôle de la poix par le produit Optimize (Buckman Inc) B) Papier sans contrôle de la poix (Tiré du site internet de Buckman Inc).

Plusieurs méthodes de contrôle de la poix sont présentement utilisées par les industries papetières pour diminuer les matières extractibles totales dans leurs

procédés. Elles consistent principalement à ajouter divers additifs (tels que l'alum, le talc, des agents dispersants et des lipases) à la pâte, à contrôler la fraîcheur des copeaux de bois ainsi qu'à appliquer des champignons sur les copeaux préalablement à leur utilisation (Burnes et al., 2000; Kallioinen et al., 2003; Kontkanen et al., 2004; Gutierrez et al., 2001; Martinez-Inigo et al., 2000; Zhang, 2000; Dorado et al., 2001; Stebbing et al., 2004; Blanco et al., 2005).

Pour le contrôle de la poix il est essentiel d'analyser non seulement l'enlèvement des matières extractibles totales, mais aussi de chaque groupe individuel car la composition de ces matières varie grandement d'une espèce de bois à l'autre. Des études ont démontré que même si un traitement pouvait enlever 50% des matières extractibles totales, cela ne réduisait pas les problèmes dans les procédés de fabrication du papier car les composés lipophiliques responsables des dépôts de poix n'étaient pas correctement dégradés (Gutierrez et al., 1998; Gutierrez et al., 1999; Gutierrez et al., 2001). Les triglycérides sont considérés comme étant les composés les plus problématiques durant les procédés de fabrication de plusieurs types de pâtes de bois mécanique et de sulfite acide (Fischer et Messner, 1992; Fujita et al., 1992). Il est scientifiquement reconnu que les lipases (Figure 5.8) sont des enzymes catalysant l'hydrolyse de longues chaînes de triglycérides (Hasan et al., 2006). Elles constituent le plus important groupe de biocatalyseurs pour des applications biotechnologiques (Hasan et al., 2006). Des chercheurs européens ont démontré que les lipases ont démontré qu'elles étaient capables de diminuer la quantité de triglycérides présente dans une pâte de bois lors d'essais en laboratoire et d'essais pilotes (Muistranta et al., 1995; Fischer et Messner, 1992). Au Japon, des essais en usine ont démontrés que des traitements à la lipase pouvaient diminuer les problèmes de poix du bois (Fujita et al., 1992). Le contrôle enzymatique de la poix du bois, via l'utilisation de ces enzymes, est actuellement utilisé à grande échelle (Bajpai, 1999). Par contre, il est important de noter que malgré ces bons résultats les lipases n'agissent essentiellement que sur les glycérides et ne dégradent donc pas les autres matières extractibles, tels que les acides

résiniques, qui forment les dépôts de poix du bois (Gutierrez et al., 2001; Zhang, 2000; Bajpai, 1999). Donc, d'autres enzymes ou méthodes agissant sur une plus vaste gamme de substrats doivent être investiguées. À ce sujet, un autre type d'enzyme pourrait être intéressant pour le contrôle de la poix: la laccase. À cause de leur habileté à oxyder une vaste gamme de substrats, différentes recherches sont en cours pour évaluer le potentiel d'oxydation des laccases envers diverses matières extractibles (Zhang, 2000; Zhang, 2002; Karlsson et al., 2001; Gutierrez et al., 2006; Gutierrez et al., 2007; Zhang et al., 2005).



**Figure 5.8** Structure protéique 3D de la lipase de *Streptomyces exfoliatus*. Les structures secondaires de la protéine sont affichées en ruban (Créé à partir de PDB id : 1JFR).

Dans le cadre de mes travaux, un de mes objectifs de recherche était également l'investigation du potentiel d'utilisation commerciale d'une nouvelle lipase microbienne (M-Lip) que nous avons clonée et exprimée pour son utilisation dans le contrôle de la poix. Étant donné que l'éventail de matières extractibles hydrolysables

par la lipase est limité, j'ai développé une technique originale pouvant agir sur une gamme plus large de substrats par le biais d'une combinaison enzyme-surfactant. Comme la laccase peut oxyder plusieurs types de substrats reliés à la poix du bois (Zhang, 2000; Zhang 2002; Karlsson et al., 2001; Gutierrez et al., 2006; Gutierrez et al., 2007; Zhang et al., 2005), j'ai également évalué la combinaison d'un surfactant de type alkanolamide avec cette classe d'enzymes.

Les résultats de cette étude illustrent bien qu'après 2 heures de traitement à 60°C, l'utilisation du surfactant a eu un impact significatif sur cinq des six groupes de matières extractibles évalués lors de mes recherches (Tableau 4.1). Il a diminué de 18% les acides gras totaux, de 25% le groupe des acides résiniques, de 14% celui des stérols, de 27% celui des stéryl d'ester et de 26% celui des triglycérides. Donc le surfactant agit sur une vaste gamme de substrats reliés aux dépôts de poix. Il s'agit d'un composé de type alkanolamide, non-ionique, qui diminue la tension de surface et offre une forte détergence autant qu'une bonne dispersion. Comparativement à d'autres surfactants de type éthoxylate et nonylphénol, le surfactant que nous avons choisi est pratiquement non-moussant. Aucun agent anti-mousse n'est requis pour prévenir la redéposition des particules de la poix. Cette caractéristique est essentielle parce qu'elle prévient certains problèmes techniques dans les procédés papetiers.

Mes résultats démontrent également qu'il y a une bonne synergie entre le surfactant et la lipase pour le contrôle de la poix (Tableau 4.1). Comparativement au traitement avec seulement le surfactant, cette combinaison a permis une meilleure réduction du groupe des acides résiniques, des stérols et des triglycérides (48%, 32% et 78% de diminution respectivement). Par contre, on peut également observer une augmentation considérable des acides gras totaux résultant de l'hydrolyse des triglycérides par le biais de la lipase. Cette augmentation est cependant moins élevée que lors de l'utilisation de la lipase seule (données non présentées). Néanmoins, cette méthode a l'avantage de combiner l'efficacité d'action de la lipase sur le groupe des

triglycérides en plus de l'efficacité d'action du surfactant sur les autres groupes d'importance dans la poix du bois.

Étant donné que les laccases peuvent agir sur une vaste gamme de substrats (Zhang, 2000; Zhanget al., 2002; Zhang et al., 2005; Karlsson et al., 2001) nous nous serions attendu à ce qu'il y ait également une bonne synergie entre cette enzyme et le surfactant (Tableau 4.1). Comparativement aux autres traitements, les résultats démontrent que cette combinaison a été plus efficace pour l'enlèvement des acides gras totaux (27% de réduction) et du groupe des fragments de lignine (56% de réduction). Par contre, ce traitement n'a pas été plus efficace pour la réduction du groupe des acides résiniques et autres groupes de matières extractibles. Une plus forte concentration de laccase a également été évaluée et cela n'a pas permis d'augmenter l'efficacité de traitement (données non présentées). Il est possible que la consistance de la pâte ait jouée un rôle dans la faible efficacité de traitement de la laccase en créant une rareté de l'oxygène disponible ou en diminuant son accessibilité aux divers substrats. D'autres études ont suggéré l'utilisation d'un système laccase-médiateur pour augmenter le rendement de dégradations de cette enzyme envers les diverses matières extractibles (Gutierrez et al., 2006; Gutierrez et al., 2007). Même si de bons rendements ont pu être obtenus par cette méthode, il est important de noter qu'elle implique l'ajout des composés phénoliques dans les procédés papetiers et conséquemment dans leurs effluents, en plus de diminuer grandement la viabilité économique de l'application des laccases car l'utilisation de médiateurs est généralement coûteuse.

L'avantage réel de l'utilisation de la laccase, pour le contrôle de la poix, se retrouve dans son efficacité d'action dans les eaux de procédés (Tableau 4.2). Étant donné que l'industrie papetière se fait imposer des normes de plus en plus strictes en ce qui concerne l'utilisation d'eau fraîche, elle doit conséquemment voir à la réutilisation de ses eaux de procédés. La fermeture de ses circuits d'eau fraîche

engendre ainsi une augmentation de la concentration des matières extractibles dans le système, ce qui devient une préoccupation majeure pour la qualité du papier produit. De bonnes méthodes de décontamination des eaux de procédés deviennent donc essentielles. Le Tableau 4.2 démontre qu'après un traitement de deux heures à 60°C, la laccase a eu un impact sur la réduction des composés de pratiquement tous les groupes à l'étude. Son utilisation dans l'eau de procédé a permis de diminuer 42% des acides gras totaux, de 43% le groupe des acides résiniques, de 14% le groupe des stéryl ester, de 26% le groupe des triglycérides et de 60% le groupe des fragments de lignine. D'autres études ont également démontré de bons résultats de l'utilisation de la laccase pour décontaminer les eaux de procédés (Zhang, 2000; Zhang et al., 2005).

Selon l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, la combinaison surfactant-lipase s'avère donc être la méthode la plus efficace et la plus prometteuse pour le contrôle de la poix dans les pâtes à papier thermomécaniques. Il faut cependant ajouter que même si le traitement de la pâte thermomécanique avec la laccase n'a pas été aussi efficace que l'on aurait pu l'espérer, son potentiel d'utilisation ne doit pas être mis de côté car il est néanmoins très intéressant pour le traitement des eaux de procédés. Finalement cette étude permet de présenter une approche combinant l'utilisation des diverses biotechnologies. L'utilisation du système surfactant-lipase pour la pâte thermomécanique, ainsi que de la laccase pour le traitement des eaux de procédés, nous offre une méthode plus complète pour le contrôle de la problématique de la poix dans l'industrie papetière.

### 5.3 Conclusion et travaux futurs

Le développement d'une laccase robuste et peu coûteuse est essentiel pour pouvoir surmonter les barrières qui empêchent une plus grande utilisation industrielle de cette classe d'enzymes. Par le biais d'un système d'expression bactérien, nous avons démontré que l'on pouvait produire une grande quantité de laccase, avec une



excellente pureté, sans étape importante de purification. L'enzyme produite est active sous une vaste gamme de pH, démontre une forte thermostabilité et est résistante à divers inhibiteurs traditionnels de la laccase. D'un point de vue commercial, cette laccase a démontré un bon potentiel pour l'oxydation et décoloration rapide de diverses encres avec l'utilisation de l'acétosyringone comme médiateur naturel. Diverses applications pratiques en conditions neutre et alcaline, pour le blanchiment du denim et le traitement des effluents, sont envisageables grâce à cette laccase alcaline. Ceci ouvre la porte à de nouvelles possibilités en matière de développement d'alternatives écologiques aux traitements chimiques actuels de l'industrie du textile.

Nous avons développé un bon système de production d'une laccase bactérienne. Par contre, ce système peut encore être amélioré. Une étude future devra être effectuée sur les conditions favorisant l'augmentation de la production de SLAC en fermenteur. Une autre recherche devra également être entreprise en vue d'évaluer plus en profondeur les capacités de décoloration de SLAC envers d'autres encres d'intérêts pour l'industrie du textile. Afin de développer un produit commercial, une analyse approfondie de divers autres médiateurs devra également être faite. La recherche de médiateur écologique et économique est essentielle pour ce type de développement technologique. D'un point de vue économique, divers ratios de concentration enzyme-médiateur devront aussi être évalués selon leur niveau d'efficacité de traitement afin de choisir le meilleur rapport qualité/prix. Finalement, des stratégies d'évolution accélérée pourront être utilisées pour optimiser l'activité et la stabilité de SLAC afin d'améliorer son potentiel commercial.

Mes travaux ont également portés sur le développement d'une solution écologique pour le contrôle de la poix dans l'industrie papetière. Par le biais de biotechnologies enzymatiques, nous avons développé une façon de diminuer les matières extractibles dans la pâte à papier ainsi que dans les eaux de procédés de cette dernière. L'efficacité de cette méthode a été quantifiée via des analyses sur GC-FID

et GC-MS. Les résultats ont démontré que la combinaison d'un surfactant écologique avec une lipase a permis de réduire efficacement une vaste gamme de matières extractibles d'une pâte thermomécanique. En combinant ce traitement biochimique de la pâte avec la décontamination des eaux de procédés via une laccase, ce traitement entier devient une alternative écologique intéressante pour le contrôle global de la poix dans l'industrie papetière.

Nous avons développé un bon système de contrôle de la poix pour l'industrie papetière. Cette méthode nécessite cependant d'autres analyses afin de confirmer son efficacité. Une étude future devra être effectuée avec diverses pâtes à papier et eaux de procédés car les conditions de fabrication du papier varient d'une usine à l'autre. D'un point de vue économique, divers ratios de concentration de surfactant et d'enzymes devront aussi être évalués selon leur niveau d'efficacité de traitement afin de choisir le meilleur rapport qualité/prix. D'autres types de surfactants, de lipases et/ou de laccases pourraient être évalués dans une étude similaire à celle que nous avons effectuée. L'utilisation de SLAC devrait, entre autre, être considérée dans ce schéma de pensée. Une étude future devra aussi être effectuée sur les conditions favorisant l'augmentation de la production de M-Lip en fermenteur. Également, des stratégies d'évolution accélérée pourront aussi être utilisées pour optimiser l'activité et la stabilité de M-Lip afin d'améliorer son potentiel commercial.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aaslyng D, Rorbaek K, Sorensen NH, (29.11.1996). An ezyme for dying keratinous fibres. International Patent Application WO9719998.
- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz G. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66:3357–3362.
- Aggelis G, Iconomou D, Christouc M, Bokas D, Kotzailias S, Christou G, et al. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research* 2003; 37:3897–3904.
- Akta N, Çiçek H, Tapınar ÜA, Kibarar G, Kolankaya N, Tanyolaç A. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. *Bioresource Technology* 2001; 80:29–36.
- Akta N, Tanyolaç A. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresource Technology* 2003; 87:209–214.
- Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria. *Trends in Biotechnology* 2000; 18:41-42.
- Allen LH, Pitch control in pulp mills, in Pitch control, wood resin and deresination, ed by Back EL and Allen LH. Tappi Press, Atlanta, 2000, pp.265-287.
- Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG, Reid ID. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* 1997; 53:215–236.
- Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernández M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69:1953–1958.
- Assavanig, A., Amornkitticharoen, B., Ekpaisal, N., Meevootisom, V. and Flegel, T.M. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992; 38: 198-202.

- Bajpai P, Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 1999; 15:147-157.
- Baker WL, Sabapathy K, Vibat M, Lonergan G. Lactase catalyzes formation of an indamine dye between 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-dimethylaminobenzoic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 1996; 18: 90–94.
- Balakshin M, Chen C-L, Gratzl JS, Kirkman AG, Jakob H. Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system—effect of variables on the reaction kinetics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001; 16:205–215.
- Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology* 1996; 58:217–227.
- Bauer CG, Kuhn A, Gajovic N, Skorobogatko O, Holt PJ, Bruce NC, et al. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1999; 364:179–183.
- Baughman GL, Perenich TA. Fate of dyes in aquatic systems: I solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1988; 7:183–199.
- Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 2002; 41:7325-7333.
- Blackburn RS. Natural polysaccharides and their interactions with dye molecules: applications in effluent treatment. *Environmental Science and Technology* 2004; 38, 4905-4909.
- Blanco A, Negro C, Borch K, Mining S, Hannuksela T and Holmbom B, Pitch control in thermomechanical pulping and papermaking by enzymatic treatments, *Appita Journal* 2005; 58(5):358-361.
- Blázquez P, Casas N, Font X, Gabarrell M, Sarrá M, Caminal G, et al. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research* 2004; 38:2166–72.
- Böhmer S, Messner K, Srebotnik E. Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988; 244:233–238.

- Bollag, J. and Leonowicz, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 1984; 48:849-854.
- Bourbonnais, R. and Paice, MG. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of ABTS. *Applied Microbial Biotechnology* 1990; 36: 823-827.
- Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63:4627-4632.
- Bourbonnais, R., Rochefort, D., Paice, MG, Renaud, S. and Leech, D. Transition metal complexes: a new class of laccase mediators for pulp bleaching. *Tappi Journal Peer Reviewed Paper* 2000; p.1-11.
- Burnes TA, Blanchette RA and Farrell RL, Bacterial biodegradation of extractives and patterns of bordered pit membrane attack in pine wood. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66:5201-5205.
- Burton SG. Laccases and phenol oxidases in organic synthesis - a review. *Current Organic Chemistry* 2003; 7:1317-1331.
- Call HP and Mücke I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (Lignozym process). *Journal of Biotechnology* 1997; 53:163-202.
- Calvo AM, Copa-Patiño JL, Alonso O, González AE. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Archives of Microbiology* 1998; 171:31-36.
- Camarero S, Garcia O, Vidal T, Colom J, del Rio JC, Gutierrez A, et al. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 2004; 35:113-20.
- Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez AT. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71:1775-1784.

- Camarero S, Ibarra D, Martinez AT, Romero J, Gutierrez A and del Rio JC. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40:1264-1271.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsute* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology* 2001; 89:131–139.
- Cantarella G, Galli C, Gentili P. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems. Catalytic or stoichiometric procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003; 22:135–144.
- Carter DN, McKenzie DG, Johnson AP, Idner K. Performance parameters of oxygen delignification. *Tappi Journal* 1997; 80:111–117.
- Carunchio F, Crescenzi C, Girelli AM, Messina A, Tarola AM. Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta* 2001; 55:189–200.
- Casa R, D'Annibale A, Pieruccetti F, Stazi SR, Giovannozzi SG, Lo Cascio B. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 2003; 50:959–966.
- Castro AIRP, Evtuguin DV, Xavier AMB. Degradation of biphenyl lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1 hydroxybenzotriazole and heteropolyanion [SiW<sub>11</sub>VO<sub>40</sub>]<sup>5-</sup>. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003; 22:13–20.
- Chakar FS, Ragauskas AJ. Formation of quinonoid structures in laccase-mediator reactions. In: Argyropoulos DS, editor. *Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis*. ACS symposium series. USA: Oxford University Press; 2001. p. 444–455.
- Chandra RP, Ragauskas AJ. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 2002; 30:855–861.
- Chefetz B, Chen Y, Hadar Y. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64:3175-3179.

- Cho S-J, Park SJ, Lim JS, Rhee YH, Shin KS. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase of *Coriolus hirsutus*. *Biotechnology Letters* 2002; 24:1337–1340.
- Claus H, Faber G, König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 59:672–678.
- Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 2004; 35:93-96.
- Claus H, Faber G, König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 59, 672-678.
- Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA, Dobson ADW. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62:4563–4567.
- Cooper P. Removing colour from dye house wastewater. *Asian Textile J* 1995; 3:52–56.
- Crecchio C, Ruggiero P, Pizzigallo MDR. Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. *Biotechnology and Bioengineering* 1995; 48:585–591.
- Crestini C, Argyropoulos DS. The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1998; 6:2161–2169.
- D'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Di Mattia E, Giovannozzi SG. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry* 1999; 34:697–706.
- D'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Giovannozzi SG. Oxiraneimmobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 2000; 77: 265–273.
- D'Annibale A, Ricci M, Quarantino D, Federic F, Fenice M. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology* 2004; 155:596–603.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. and Bally, R. Purification and characterisation of the first bacterial laccase in rhizospheric bacteria, *Azospirillum lipoferum*, *Soil Biology and Biochemistry* 2000; 32: 919-927.

- Dodor DE, Hwang HM, Ekunwe SIN. Oxidation of anthracene and benzo[a] pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 2004; 35:210–217.
- Domínguez A, Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Dye decolourization by *Trametes hirsuta* immobilised into alginate beads. *World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2005; 21:405–409.
- Dorado J, van Beek TA, Claassen FW and Sierra-Alvarez R, Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandera* sp. and *Trametes versicolor*. *Wood Science and Technology* 2001; 35:117-125.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. and Davies, G.J. Crystal structure of the type-2 Copper depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology* 1998; 5:310-316.
- Durán N, Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 2000; 28:83–99.
- Durante D, Casadio R, Martelli L, TascoG, Portaccio M, De Luca P. Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2004; 27:191–206.
- Edwards W, Leukes WD, Bezuidenhout J. Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxidase and laccase: application in the defouling of polysulphone membranes. *Journal of Desalination* 2002; 149:275–278.
- Eggen T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1999; 44:117–126.
- Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K.L. The ligninolytic system of the white rot-fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterisation of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62 (4):1151-1158.
- Eggert, C., LaFayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.L. and Dean, J.F.D. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64 (5): 1766-1772.



- Endo K, Hayashi Y, Hibi T, Hosono K, Beppu T, Ueda K. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 2003; 133:671-677
- Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:19416-19425.
- Fabbrini M, Galli C, Gentili P, Macchitella D. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. *Tetrahedron Letters* 2001; 42:7551–7553.
- Farnet, A.M., Criquet, S., Tagger, S., Gil, G. and Le Petit, J. Purification, partial characterisation, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology* 2000; 46: 189-194.
- Felby C, Pedersen LS, Nielsen BR. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung* 1997; 51:281–286.
- Ferry Y, Leech D. Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. *Electroanalysis* 2005; 17:2113–2119.
- Filazzola, M.T., Sannino, F., Rao, M.A. and Giangreda, L. Bioremediation and biodegradation: Effect of various pollutants and soil- like constituents on laccase from *Cerrena unicolor*. *Journal of Environmental Quality* 1999; 28: 1929-1938.
- Fischer K and Messner K. Reducing troublesome pitch in pulp mills by lipolytic enzymes. *Tappi Journal* 1992; 75:130-134.
- Freire RS, Durán N, Kubota LT. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta* 2001; 54:681–686.
- Freire RS, Durán N, Kubota LT. Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of kraft E1 paper mill effluent. *Analytica Chimica Acta* 2002; 463:229–238.

- Fritz-Langhals E, Kunath B. Synthesis of aromatic aldehydes by laccase-mediator assisted oxidation. *Tetrahedron Letters* 1998; 39:5955–5956.
- Froehner, S.C. and Eriksson, K.E.L. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. *Journal of Biotechnology* 1974; 120(1): 458-465.
- Fujita Y, Awaji H, Taneda H, Matsukura M, Hata K, Shimoto H, Sharyo M, Sakaguchi H and Gibson K. Recent advances in enzymatic pitch control. *Tappi Journal* 1992; 75:117-122.
- Fukuda T, Uchida H, Takashima Y, Uwajima T, Kawabata T, Suzuki M. Degradation of bisphenol a by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 284:704–706.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J, Haltrich D. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 2002; 148:2159-2169
- Gardiol AE, Hernandez RJ, Reinhammar B, Harte BR. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 1996; 18:347–352.
- Georis J, Lomascolo A, Camarero S, Dorgeo V, Herpoel I, Asther M, et al. *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. *Meded Fac Landbouwkd Toegep Biol Wet* 2003; 68:263–266.
- Golz-Berner K, Walzel B, Zastrow L, Doucet O. (04.03.2004). Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. *International Patent Application WO2004017931*.
- Gómez J, Pazos M, Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *Journal of Food Engineering* 2005; 68:315–319.
- Gomes SASS, Rebelo MJF. A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors* 2003; 3:125.
- Gomes SASS, Nogueira JMF, Rebelo MJF. Amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics* 2004; 20:1211–1216.
- Gupta G, Rajendran V, Atanassov P. Laccase biosensor on monolayermodified gold electrode. *Electroanalysis* 2003; 15:1577–1583.

- Gutierrez A, del Rio JC, Gonzalez-Vila FJ and Martin F. Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1998; 823:449-455.
- Gutierrez A, del Rio JC, Martinez MJ and Martinez AT. Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* Wood. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65:1367-1371.
- Gutierrez A, del Rio JC, Jesus Martinez M and Martinez AT. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends in Biotechnology* 2001; 19:340-348.
- Gutierrez A, del Rio JC, Rencoret J, Ibarra D and Martinez AT. Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006; 72:845-851.
- Gutierrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, del Rio JC and Martinez AT. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental Science & Technology* 2007; 41:4124-4129.
- Haghighi B, Gorton L, Ruzgas T, Jönsson LJ. Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 2003; 487:314.
- Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature structural biology* 2002; 9:601-605.
- Han S, Fang G, Deng Y, Li P, Asther M, Sigoillot J-C. Efficient effects on enhancement bleachabilities of soda-AQ wheat-straw pulps by laccase treatment. *Proceedings of the international symposium on emerging technologies of pulping and papermaking 2nd*, Guang zhou, China, Oct. 9–11; 2002.
- Hao OJ, Kim H and Chiang PC. Decolorization of Wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 1999; 30, 449 – 505.
- Hardin, I.R., Cao, H., Wilson, S.S. and Akin, D.E. Decolourisation of textile wastewater by selective fungi. *AATCC Review* 2000; 32 (11): 38-42.

- Hasan F, Shah AA and Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 39:235-251.
- Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 2004; 39:1415-1419.
- Huang H, Cai R, Du Y, Zeng Y. Flow-injection stopped-flow spectrofluorimetric kinetic determination of total ascorbic acid based on an enzyme-linked coupled reaction. *Analytica Chimica Acta* 1995; 309:271-275.
- Hublik G, Schinner F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 27:330-336.
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of bacteriology* 2001; 183:5426-5430.
- Hüttermann A, Mai C, Kharazipour A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 55:387-94.
- Itoh K, Fujita M, Kumano K, Suyama K, Yamamoto H. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biology & Biochemistry* 2000; 32:85-91.
- Jacob H, Del Grosso M, Kuever A, Nimmerfroh N, Suess HU. Delignification of chemical pulp with laccase and mediators. A concept with a future? *Papier* 1999; 53:85-95.
- Jahmeerbacus MI, Kistamah N and Ramgulam RB. Fuzzy control of dyebath pH in exhaust dyeing. *Coloration Technology* 2004; 120:51-55
- Jaouani A, Guillen F, Penninckx MJ, Martinez AT, Martinez MJ. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 36:478-486.
- Jarosz-Wilkolazka A, Ruzgas T, Gorton L. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology* 2004; 35:238-241.

- Jarosz-Wilkolazka A, Ruzgas T, Gorton L. Amperometric detection of mono- and diphenols at Cerrena unicolor laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. *Talanta* 2005; 66:1219–1224.
- Johannes C, Majcherczyk A, Huttermann A. Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *Journal of Biotechnology* 1998; 61:151–156.
- Johannes C, Majcherczyk A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66:524–528.
- Jolivalt, C., Raynal, A., Caminade, E., Kokel, B., Le Goffic, F. and Mougín, C. Transformation of N',N'-dimethyl-N=(hydroxyphenyl)ureas by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999; 51:676–681.
- Jolivalt C, Brenon S, Caminade E, Mougín C, Pontié M. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *Journal of Membrane Science* 2000; 180:103–113.
- Juang RS, Tseng RL, Wu FC, Lin SJ. Use of chitin and chitosan in lobster shell wastes for colour removal from aqueous solutions. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 1996; 31:325–338.
- Jung H, Hyun K, Park Ch. Production of laccase and bioremediation of pentachlorophenol by wood-degrading fungus *Trichophyton* sp. LKY-7 immobilized in Ca-alginate beads. *Polpu Chongi Gisul* 2003; 35:80–86.
- Kallioinen A, Vaari A, Ratto M, Konn J, Siika-aho M and Viikari L, Effects of bacterial treatments on wood extractives. *Journal of Biotechnology* 2003; 103:67–76.
- Kandioller G, Christov L. Evaluation of the delignification and bleaching abilities of selected laccases with HBT on different pulps. In: Argyropoulos DS, editor. *Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis*. ACS symposium series, Vol. 785. USA: Oxford University Press; 2001. p. 427–443.
- Kandelbauer A and Guebitz G. Bioremediation for the decolorization of textile dyes — A Review. *Environmental Chemistry* 2005; p 269–288.

- Kang KH, Dec J, Park H, Bollag JM. Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Research* 2002; 36:4907–4915.
- Karamyshev AV, Shleev SV, Koroleva OV, Yaropolov AI, Sakharov IY. Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 33:556–564.
- Karlsson S, Holmbom B, Spetz P, Mustranta A and Buchert J, Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 55:317–320.
- Kasinath A, Novotny C, Svobodova K, Patel KC, Šašek V. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packedbed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32:167–173.
- Kenealy WR, Jeffries TW. Enzyme Processes for Pulp and Paper: A Review of Recent Developments. In: Goodell B, Nicholas DD, Schultz TP (eds) *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*, ACS symposium series 845, Washington, 2003; pp 210–239.
- Keum YS, Li QX. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 2004; 56:23–30.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annual review of Microbiology* 1987; 41: 465–505.
- Knutson K, Ragauskas A. Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnology Progress* 2004; 20:1893–1896.
- Kontkanen H, Tenkanen M, Fagerstrom R and Reinikainen T, Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations. *Journal of Biotechnology* 2004; 108:51–59.
- Kontkanen H, Saloheimo M, Pere J, Miettinen-Oinonen A and Reinikainen T, Characterization of *Melanocarpus albomyces* steryl esterase produced in *Trichoderma reesei* and modification of fibre products with the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006; 72:696–704.
- Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL. Chapter 2: Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. In: Eriksson KEL, editor. *Biotechnology in the Pulp and paper industry. Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin: Springer Verlag; 1997.

- Kulys J, Vidziunaite R, Schneider P. Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32:455–463.
- Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules* 2003; 4:1394–1399.
- Kuuva T, Lantto R, Reinikainen T, Buchert J, Autio K. Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocoll* 2003; 17:679–684.
- Kuznetsov BA, Shumakovich GP, Koroleva OV, Yaropolov AI. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 2001; 16:73–84.
- Lang G, Cotteret J, (22.07.1999). Hair dye composition containing a laccase. (L'Oreal, Fr.). International Patent Application WO9936036.
- Lante A, Crapisi A, Krastanov A, Spettoli P. Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochemistry* 2000; 36:51–58.
- Leech D, Daigle F. Optimisation of a reagentless laccase electrode for the detection of the inhibitor azide. *Analyst* 1998; 123:1971–1974.
- Leite OD, Lupetti KO, Fatibello-Filho O, Vieira IC, de Barbosa AM. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccaseperoxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta* 2003; 59:889–896.
- Leonowicz, A., Szklarz, G. and Wojtas-Wasilewka, M. The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (Peritan Na). *Phytochemistry* 1985; 24(3): 393-396.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 2001; 41:185-227.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. and Golovleva, L. 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidises non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Letters* 1997; 413:446-448.

- Levin L, Forchiassin F, Viale A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochemistry* 2005; 40:1381–1387.
- Levine, W.G. Laccase, a review. In: *The biochemistry of copper*, Academic Press Inc., New York, 1965; 371-385.
- Lisdat F, Wollenberger U, Makower A, Hortnagl H, Pfeiffer D, Scheller FW. Catecholamine detection using enzymatic amplification. *Biosensors and Bioelectronics* 1997; 12:1199–1211.
- Lorenzo M, Moldes D, Rodríguez Couto S, Sanromán A. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* 2002; 82:109–113.
- Lucas M, De La Rubia T, Martinez J. Oxidation of low molecular weight aromatic components of olive-mill wastewaters by a *Trametes versicolor* laccase. *Polyphenols Actual* 2003; 23:36–37.
- Luisa M, Goncalves FC, Steiner W. Purification and characterization of laccase from a newly isolated wood-decaying fungus. In: Jeffries TW, Viikari L (eds) *Enzymes for pulp and paper processing*. American Chemical Society, Washington, 1996, 258–265
- Lund M, Ragauskas AJ. Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 55:699–703.
- Mai C, Majcherczyk A, Hüttermann A. Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 27:167–175.
- Maceiras R, Rodríguez Couto S, Sanromán A. Influence of several inducers on the synthesis of extracellular laccase and in vivo decolourisation of Poly R-478 by semi-solid-state cultures of *Trametes versicolor*. *Acta Biotechnologica* 2001; 21:255–264.
- Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn B, Canters GW. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science* 2004; 13:2388-2397.



- Madzak C, Mimmi MC, Caminade E, Brault A, Baumberger S, Briozzo P, Mougin C, Jolival C. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein engineering, design and selection* 2006; 19:77-84.
- Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 1998; 22:335-341.
- Majcherczyk A, Johannes C. Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1474:157-162.
- Manu B and Chaudhari S. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Bioresource Technology* 2002; 82, 225-231
- Marko-Varga G, EmnCUS J, Gotton L, Ruzgas T. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends in Analytical Chemistry* 1995; 14:319-328.
- Martinez-Inigo MJ, Gutierrez A, del Rio JC, Martinez MJ and Martinez AT, Time course of fungal removal of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* wood. *Journal of Biotechnology* 2000; 84:119-126.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of biological chemistry* 2002; 277:18849-18859.
- Mathiasen TE. Laccase for improved beer storage. *Trends in Food Science & Technology* 1996; 7:272.
- Mayer, A.M. Polyphenoloxidases in plants: recent progress. *Phytochemistry* 1987, 26:11-20.
- Mayer AM and Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 2002; 60:551-565.
- Mccarthy JT, Levy VC, Lonergan GT, Fecondo JV. Development of optimal conditions for the decolourisation of a range of industrial dyes using *Pycnoporus cinnabarinus* laccase. *Hazard Ind Waste* 1999; 31:489-498.

- McKay G. Waste colour removal from textile effluents. *Am Dyest Report* 1979; 68:29–36.
- Medvedeva, S., Volchatova, I., Kanitskaya, L., Stupina, E. and Babkin, V. Oxidative biotransformation of phenol substrates by white rot fungus. 8th International symposium on wood and pulping chemistry, 1995; 2: 57-62.
- Micard V, Thibault JF. Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins. *Carbohydrate Polymers* 1999; 39:265–273.
- Michniewicz A, Ledakowicz S, Jamroz T, Jarosz-Wilkolazka A, Leonowicz A. Decolorization of aqueous solution of dyes by the laccase complex from *Cerrena unicolor*. *Biotechnologia* 2003; 4:194–203.
- Mikolasch A, Hammer E, Jonas U, Popowski K, Stielow A, Schauer F. Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase. *Tetrahedron* 2002; 58:7589–7593.
- Minussi RC, Pastore GM, Duran N. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technology* 2007; 98:158-164
- Mishra G, Tripathy M. A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage* 1993; 40:35–38.
- Moeder M, Martin C, Koeller G. Degradation of hydroxylated compounds using laccase and horseradish peroxidase immobilized on microporous polypropylene hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science* 2004; 245:183–190.
- Moldes D, Gallego PP, Rodríguez Couto S, Sanromán A. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters* 2003; 25:491–495.
- Moldes D, Sanroman MA. Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006; 22:1197-1204
- Mougin C, Jolival C, Malosse C, Chaplain V, Sigoillot JC, Asther M. Interference of soil contaminants with laccase activity during the transformation of complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media. *Polycyclic Aromatic Compound* 2002; 22:673–688.

- Murugesan K. Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian journal of experimental biology* 2003; 41:1239–1248.
- Mustafa R, Muniglia L, Rovel B, Girardin M. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydroorganic biphasic system. *Food Research International* 2005; 38:995-1000.
- Mustranta A, Fagernas L and Viikari L, Effects of lipases on birch extractives. *Tappi Journal* 1995; 78:140-146.
- Nicotra S, Cramarossa MR, Mucci A, Pagnoni UM, Riva S, Forti L. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron* 2004; 60:595–600.
- Niku-Paavola M-L, Viikari L. Enzymatic oxidation of alkenes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2000; 10:435–444.
- Norsker M, Jensen M, Adler-Nissen J. Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocoll* 2000; 14:237–243.
- Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz G, Zvaunya R, Read JS, Steiner W. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology* 2002; 84:259–263.
- Okazaki S-Y, Michizoe J, Goto M, Furusaki S, Wariishi H, Tanaka H. Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 2002; 31:227–232.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. and Jurasek, L. Oxidative bleaching enzymes: A review. *Journal of pulp and paper science* 1995a; 21 (8): 280-284.
- Paice MG, Bourbonnais R, Reid ID. Bleaching kraft pulps with oxidative enzymes and alkaline hydrogen peroxide. *Tappi Journal* 1995b; 78:161–169.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. and Sannia, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272 (50): 31301-31307.

- Palmieri G, Cennamo G, Sannia G. Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 36:17–24.
- Palmore GTR, Kim H-H. Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *Journal of Electro - analytical Chemistry* 1999; 565:110–117.
- Pazarlıoğlu NK, Sarıışık M, Telefoncu A. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry* 2005; 40:1673–1678.
- Pearce CI, Lloyd JR and Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments* 2003; 58:179-196.
- Peralta-Zamora P, Pereira CM, Tiburtius ERL, Moraes SG, Rosa MA, Minussi RC, et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental* 2003; 42:131–144.
- Perie FH, Reddy GVB, Blackburn NJ, Gold MH. Purification and Characterization of Laccases from the White-Rot Basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998; 353:349-355
- Perry, C.R., Matcham, S.E., Wood, D.A. and Thurston, C.F. The structure of lacase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 1993; 139: 171-178.
- Petersen BR, Mathiasen TE. Deoxygenation using laccase enzyme. *Trends in Food Science & Technology* 1997; 8:249.
- Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65:3805–3809.
- Piontek K, Antorini M and Choinowski T, Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:37663-37669.
- Pointing SB. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 57:20–33.

- Poots VJP, McKay JJ. The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents—I Peat. *Water Research* 1976; 10:1061–1066.
- Poppius-Levlin K, Tamminen T, Kalliola A, Ohra-aho T. Characterization of residual lignins in pulps delignified by laccase/N-hydroxyacetanilide. In: Argyropoulos DS, editor. *Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis*. ACS symposium series, Vol. 785. USA: Oxford University Press; 2001. p. 358–372.
- Potin O, Veignie E, Rafin C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology* 2004; 51:71–78.
- Rehorek A, Tauber M, Gubitz G. Application of power ultrasound for azo dye degradation. *Ultrasonics sonochemistry* 2004; 11:177–182.
- Reid, I.D. and Paice, M.G. Bioological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* 1994; 13:369-376.
- Reyes P, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnology letters* 1999; 21:875–880.
- Riu J, Schönsee I, Barcelo D. Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 1998; 33:653–663.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R and Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 2001; 77:247-255.
- Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. *Journal of Food Engineering* 2005a; 71:208–213.
- Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourization ability. *Journal of Food Engineering* 2006a; 73:388–393.

- Rodríguez Couto S, Hofer D, Sanromán MA, Gübitz GM. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor. Application to decolourisation of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Sciences* 2004a; 4:233–238.
- Rodríguez Couto S, Rosales E, Gundín M, Sanromán MA. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* sp. *Journal of Food Engineering* 2004b; 64:423–428.
- Rodríguez Couto S, Sanromán MA, Hofer D, Gübitz GM. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourisation of textile dyes. *Bioresource Technology* 2004c; 95:67–72.
- Rodríguez Couto S, Sanromán MA, Gübitz GM. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* 2005b; 58:417–422.
- Rodríguez Couto S, López E, Sanromán MA. Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. *Journal of Food Engineering* 2006b; 74:263–267.
- Rodríguez Couto S, Gundín M, Lorenzo M, Sanromán A. Screening of supports for laccase production by *Trametes versicolor* in semisolid-state conditions. Determination of optimal operation conditions. *Process Biochemistry* 2002; 38:249–255.
- Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 2006c; 24:500–513.
- Roure M, Delattre P, Froger H, (03.03.1992). Composition for an enzymic coloration of keratin fibres, especially for hair and its use in a dyeing process. European Patent Application EP0504005.
- Roy JJ, Abraham TE, Abhijith KS, Sujith kumar PV, Thakur MS. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosensors and Bioelectronics* 2005; 21:206–211.
- Saito T, Kato K, Yokogawa Y, Nishida M, Yamashita N. Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004; 98:64–66.
- Sanchez-Amat, A. and Solano, F. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp shares catalytic capabilities of tyrosinases

- and laccases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 240: 787-792.
- Schäfer A, Specht M, Hetzheim A, Francke W, Schauer F. Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*. *Tetrahedron* 2001; 57:7693–7699.
- Schliephake K, Mainwaring DE, Lonergan GT, Jones IK, Baker WL. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 27:100–107.
- Schlosser D., Grey R. and Fritsche W. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbial Biotechnology* 1997; 47: 412-418.
- Sealey J, Ragauskas AJ, Elder TJ. Investigations into laccase-mediator delignification of kraft pulps. *Holzforschung* 1999; 53:498–502.
- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science* 2006; 43:152–159.
- Semenov AN, Lomonosova IV, Berezin V, Titov I. Peroxidase and laccase as catalysts for removal of phenylhydrazide protecting group under mild conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 1993; 42: 1137–1141.
- Setti L, Giuliani S, Spinozzi G, Pifferi PG. Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme and Microbial Technology* 1999; 25:285–289.
- Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007; 23:823-832.
- Slomczynski D, Nakas JP, Tanenbaum SW. Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and environmental microbiology* 1995; 61:907-912.
- Soares GMB, Costa-Ferreira M, Pessoa de Amorim MT. Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. *Bioresource Technology* 2001a; 79:171–177.

- Soares GMB, Pessoa de Amorim MT, Costa-Ferreira M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology* 2001b; 89:123–129.
- Soares GMB, Pessoa Amorim MT, Hrdina R, Costa-Ferreira M. Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. *Process Biochemistry* 2002; 37:581–587.
- Stebbing DW, Zhang X, Soong G, Mansfield SD and Saddler JN, Fungal enzyme treatment of newsprint mill white water: impact on white water and paper properties, *Journal of Pulp and Paper Science* 2004; 30:3–8.
- Stephen JA. Electrooxidation of dyestuffs in waste waters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 1995; 62:111–117.
- Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2003; 67:2167–2175.
- Thakker, G.D., Evans, C.S. and Rao, K.K. Purification and characterisation of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992; 37: 321–323.
- Tamminen T, Kleen M, Ohra-aho T, Poppius-levlin K. Chemistry of mediated-laccase delignification analyzed by pyrolysis-GC/MS. *Journal of Pulp and Paper Science* 2003;29:319–324.
- Tanaka T, Tonosaki T, Nose M, Tomidokoro N, Kadomura N, Fujii T, et al. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with lactase from *Trametes* sp. in a rotating reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2001; 92:312–316.
- Tanaka T, Nose M, Endo A, Fujii T, Taniguchi M. Treatment of nonylphenol with laccase in a rotating reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2003; 96:541–546.
- Tavares APM, Gamelas JAF, Gaspar AR, Evtuguin DV, Xavier AMRB. A novel approach for the oxidative catalysis employing polyoxometalate–laccase system: application to the oxygen bleaching of kraft pulp. *Catalysis Communications* 2004; 5:485–489.



- Thurston, C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994; 140:19-26.
- Timur S, Pazarlıoğlu N, Pilloton R, Telefoncu A. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. *Journal Sensors and Actuators B: Chemical* 2004; 97:132–136.
- Tsioulpas A, Dimou D, Iconomou D, Aggelis G. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* 2002; 84:251–257.
- Uyama H, Kobayashi S. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2002; 19–20:117–127.
- Ünyayar A, Mazmancı MA, Ataçağ H, Erkurt EA, Coral G. A Drimaren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia troglia* one step isolation and identification. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 36:10–16.
- Uchida H, Fukuda T, Miyamoto H, Kawabata T, Suzuki M, Uwajima T. Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 287:355–358.
- Vandertol-Vanier HA, Vazquez-Duhalt R, Tinoco R, Pickard MA. Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2002; 29:214–220.
- Vianello F, Cambria A, Ragusa S, Cambria MT, Zennaro L, Rigo A. A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element. *Biosensors and Bioelectronics* 2004; 20:315–321.
- Vinod S. Enzymatic decolourisation of denims: a novel approach. *Colourage* 2001; 48:25–26.
- Wahleitner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A. and Schneider, P. The identification and characterisation of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 1996; 29:395-403.
- Walker, J.W.R. and McCallion, R.F. The selective inhibition of ortho and paradiphenol oxidases. *Phytochemistry* 1980; 19: 373-373.

- Xiao Y, Zhang S, Hu Q, Jiang W, Pu Ch, Shi Y. Immobilization of fungal laccase on chitosan and its use in phenolic effluents treatment. *Weishengwu Xuebao* 2003; 43:245–250.
- Xu, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 1996; 35: 7608-7614.
- Xu F. Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. New York: JohnWiley & Sons; 1999. p. 1545–1554.
- Yaver, D.S., Berka, R.M., Brown, S.H. and Xu, F. Cloning, characterisation, expression and commercialisation of fungal laccases. 8th symposium on recent advances in lignin biodegradation and biosynthesis, 2001; 40.
- Zavarzina AG, Leontievsky AA, Golovleva LA, Trofimov SY. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study. *Soil Biology & Biochemistry* 2004; 36:359–369.
- Zhang X, The effects of white-water dissolved and colloidal fractions on paper properties and effects of various enzyme treatments on the removal of organic components. *Pulp and Paper Canada* 2000; 101-3:59–62.
- Zhang X, Eigendorf G, Stebbing DW, Mansfield SD, Saddler JN. Degradation of trilinolein by laccase enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002; 405:44–54.
- Zhang X, Renaud S and Paice M, The potential of laccase to remove extractives present in pulp and white water from TMP newsprint mills. *Journal of Pulp and Paper Science* 2005; 31-4:175-180.
- Zille A, Tzanov T, Guebitz GM, Cavaco-Paulo A. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters* 2003; 25:1473–1477.